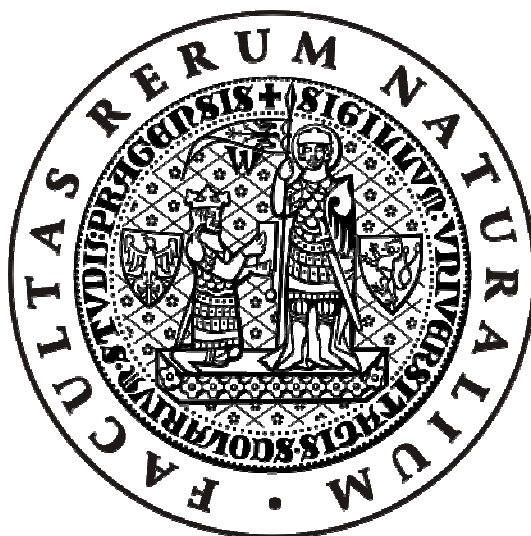


**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Bc. Tomáš Pánek

Evoluce anaerobních heteroloboseí Evolution of anaerobic Heterolobosea

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 04. 2011

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména svému školiteli, Ivanu Čepičkovi, za pomoc při sepisování této práce, za poskytnutí materiálního zázemí i odborné vedení během jejího řešení. Můj dík patří také Vladimíru Hamplovi za pomoc s analýzou konkatenátu a rady týkající se počítačového klastru Darwin. Dále bych rád poděkoval Martinu Kolískovi za rady týkající se analýzy konkatenátu v programu MrBayes.

Děkuji také Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekty GAUK 21610/2010, 301711/2011), Grantové agentuře České republiky (projekty 206/08/P275, GAČR P506/11/1317) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (projekt MSM0021620828), které řešení této práce finančně podpořily.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem, kteří během svých expedic nasbírali vzorky sedimentu, z něhož byli vykultivováni prvoci zkoumaní v této práci.

Dík patří i mým nejbližším, za trpělivost a shovívavost.

OBSAH

ABSTRAKT	07
ABSTRACT	08
1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	09
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. Morfologie a buněčná struktura skupiny Heterolobosea	11
2.1.1. Struktura mastigontu	12
2.1.2. Transformace měňavky na bičíkaté stádium u druhu <i>Naegleria gruberi</i>	14
2.1.3. Mnohobuněčná stadia	17
2.2. Ekologie skupiny Heterolobosea	18
2.3. Anaerobní zástupci heteroloboseí	20
2.4. Anaerobní mitochondrie heteroloboseí a její specifika	24
2.5. Fylogeneze a taxonomie skupiny Heterolobosea	27
2.5.1. Kompletní taxonomie skupiny Heterolobosea na úrovni rodů	27
2.5.2. Fylogeneze skupiny Heterolobosea	35
2.5.3. Region 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí	36
3. MATERIÁL A METODY	38
3.1. Izolace a kultivace prvoků	38
3.1.1. Složení a příprava používaných médií	38
3.1.2. Metody sběru vzorků	39
3.1.3. Metody kultivace	39
3.1.4. Kryoprezervace kultur prvoků	40
3.2. Světelná mikroskopie (LM)	41

3.2.1. Nativní preparáty.....	41
3.2.2. Barvení podle Giemsa-Romanowski.....	41
3.2.3. Barvení protargolem podle Bodiana	41
3.2.4. Pozorování, fotodokumentace a měření buněk v preparátech	43
3.3. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	44
3.3.1. Příprava preparátů pro TEM.....	44
3.3.2. Pozorování ultratenkých řezů a jejich fotodokumentace	46
3.4. Molekulárně – biologické techniky	46
3.4.1. Izolace DNA	46
3.4.2. Amplifikace DNA a purifikace PCR produktů.....	46
3.4.3. Klonování PCR produktů	51
3.4.4. Sekvence DNA	54
3.5. Práce se sekvencemi a tvorba fylogenetických stromů	55
3.5.1. Vyhodnocení sekvencí a tvorba alignmentu	55
3.5.2. Fylogenetická analýza SSU rDNA	56
3.5.3. Fylogenetická analýza genů pro α - a β -tubulin	57
3.5.4. Fylogenetická analýza konkaténátu SSU rDNA a genů pro α - a β -tubulin ..	57
3.5.5. AU TEST	58
3.5.6. Identifikace a rekonstrukce helixu 17-1 v SSU rRNA	59
4. VÝSLEDKY	60
4.1. Izolovaná a kultivovaná anaerobní/mikroaerofilní Heterolobosea	60
4.2. Sekvence vybraných genů	62
4.3. Fylogenetické analýzy a AU TEST	62
4.4. Hledání regionu 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA	70
4.5. Základní morfologická charakterizace	77

4.6. Ultrastruktura	93
5. DISKUSE	105
5.1. Hlavní anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae).....	105
5.1.1. Taxonomické okénko	106
5.1.2. Synapomorfie skupiny Psalteriomonadidae	107
5.1.3. Základní vnitřní členění Psalteriomonadidae	107
5.1.4. Rozlišení rodů a druhů v rámci Psalteriomonadidae	108
5.1.5. Ekologie skupiny Psalteriomonadidae	110
5.1.6. Možná fylogenetická pozice druhů <i>V. anaerobica</i> a <i>L. vulgaris</i>	111
5.2. Organismus PC4AM	112
5.2.1. Morfologie PC4AM	114
5.2.2. Hypotéza o fylogenetickém postavení PC4AM	115
5.2.3. <i>Stephanopogon</i> – <i>Percolomonas cosmopolitus</i> – PC4AM.....	116
5.3. Polyfylie Percolomonas – konvergence nebo plesiomorfie?	117
5.4. Měňavka a bičíkovec – výhody a možné důvody zániku	119
5.5. Kritika druhového konceptu heteroloboseí	120
5.6. Fakultativně anaerobní předek heteroloboseí?	121
6. ZÁVĚR	122
7. POUŽITÁ LITERATURA	124

ABSTRAKT

Heterolobosea jsou skupinou zahrnující převážně volně žijící měňavky, bičíkovce a améboflageláty s blízkým příbuzenským vztahem k euglenozoím a jakobidům (superskupina Excavata). Přinejmenším dvě linie heteroloboseí (*Psalteriomonadidae* a extrémně halofilní *Pleurostomum*) redukovaly mitochondrie a přizpůsobily se životu v prostředí s nedostatkem kyslíku. Navíc bylo v rámci aerobních rodů heteroloboseí popsáno několik druhů, o kterých se předpokládá, že jsou anaerobní. Doposud z nich nebyla získána sekvenční data, a proto jejich fylogenetická pozice zůstává neobjasněna. Cílem této práce je prozkoumat diverzitu a fylogenetickou pozici těchto a popřípadě i jiných, dosud neobjevených anaerobních heteroloboseí.

Z mořského, sladkovodního a brakického prostředí bylo izolováno a kultivováno celkem 34 kmenů anaerobních bičíkovců, měňavek a améboflagelátů patřících mezi Heterolobosea. 33 z těchto izolátů patří mezi *Psalteriomonadidae*. Na základě fylogenetické analýzy jejich SSU rDNA a porovnáním jejich morfologie byly uvnitř skupiny *Psalteriomonadidae* identifikovány 2 nové rody a 3 nové druhy. Ukázalo se, že rod *Percolomonas* je polyfyletický. Morfologická podobnost několika nepříbuzných druhů, které do něj doposud byly řazeny, má zřejmě plesiomorfni charakter.

Mořský izolát PC4AM je morfologicky unikátní a jeho morfologie nemá v rámci heteroloboseí ani eukaryot srovnání. Představuje naopak nejvíce odvozenou linii heteroloboseí, která kdy byla objevena. V práci je prezentována také buněčná struktura tohoto prvoka a předpokládaná fylogenetická pozice na základě analýzy tří genů. Pravděpodobně se jedná o novou anaerobní linii skupiny Heterolobosea.

Klíčová slova: Heterolobosea, diverzita, hydrogenosom, bičíkovec, měňavka.

ABSTRACT

Heterolobosea is a group of mainly free-living amoebae, flagellates and amoeboflagellates closely related to Euglenozoa and Jakobida (supergroup Excavata). At least two heterolobosean lineages have reduced their mitochondria and live in low concentrations of oxygen (Psalteriomonadidae and extremely halophilic *Pleurostomum*). Moreover, some other presumably anaerobic species have been described in aerobic heteroloboseid genera, but their sequence data are still missing. The aim of this study is to recognize the diversity and phylogenetic position of both already described and novel non-hypersaline anaerobic heteroloboseans.

We have isolated and cultivated 34 strains of free-living heterolobosean flagellates, amoebae and amoeboflagellates from freshwater, brackish and marine microoxic/anoxic habitats. 33 of these strains constitute a single clade (Psalteriomonadidae). We recognize 2 new genera and 3 new species. Phylogenetic analysis of SSU rDNA showed the genus *Percolomonas* is polyphyletic. The similar morphology of species formally placed within the genus *Percolomonas* is probably plesiomorphic.

Finally, the marine strain PC4AM is morphologically unique and its morphology can not be compared with other heteroloboseans and eukaryotes. It is probably the most derived heterolobosean. Its cell structure and the possible phylogenetic position within Heterolobosea is presented. It likely forms a new lineage of anaerobic Heterolobosea.

Key words: Heterolobosea, diversity, hydrogenosome, flagellate, amoeba.

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Taxon Heterolobosea je druhově nepočetná skupina měňavek, bičíkovců a améboflagelátů patřící do superskupiny Excavata, a to jako sesterská linie euglenozoi (Hampl *et al.* 2009). Ačkoliv většina heteroloboseí žije ve vodních sedimentech a v půdě, kde se živí bakteriemi, je jejich ekologická diverzita na poměry eukaryot skutečně nebývalá. Obývají hypersalinní i anoxická prostředí, prosperují též v podmínkách extrémní acidity nebo ve vysokých či nízkých teplotách. Zdá se, že do těchto prostředí pronikli dokonce opakovaně. Přinejmenším druhy *Naegleria fowleri* a *Paravahlkampfia francinae* způsobují vážná a smrtelná onemocnění člověka. Někteří příslušníci skupiny Heterolobosea dokonce vytváří mnohobuněčná stádia. V poslední době se ukazuje, že mezi Heterolobosea spadají i někteří prvoci, které na základě morfologie nebylo možné zařadit do konkrétní eukaryotické skupiny (např. rod *Stephanopogon*).

Tato práce se zaměřuje na Heterolobosea žijící v kyslíkem chudých prostředích a jejich charakterizaci. V současnosti je totiž známo několik druhů anaerobních a mikroaerofilních heteroloboseí, z nichž pouze část byla studována metodami molekulární fylogenetiky. Ukázalo se přitom, že tyto druhy jsou příslušníky jedné jediné evoluční linie (Psalteriomonadidae).

Někteří v minulosti popsaní zástupci anaerobních/mikroaerofilních heteroloboseí však morfologicky spadají do rodů vybavených klasickými mitochondriemi a jsou do nich dodnes taxonomicky řazeni. Protože z těchto druhů doposud chybí jakákoliv sekvenční data, je potřeba jejich fylogenetickou pozici ověřit a prozkoumat možný vícenásobný přechod klasické mitochondrie heteroloboseí k anaerobním variantám bez krist.

Ke studiu anaerobních a mikroaerofilních heteroloboseí vybízí i další fakt. Modelový organismus *Naegleria gruberi*, který patří do skupiny Heterolobosea a má klasické mitochondrie s kristami, ve svém genomu kóduje některé enzymy typické pro hydrogenosomy. Uvažuje se, že je schopen přejít z aerobního metabolismu pyruvátu na anaerobní (Fritz-Laylin *et al.* 2010; Ginger *et al.* 2010). To vše činí skupinu Heterolobosea potenciálně zajímavou z hlediska evoluce anaerobního způsobu života jako takového.

Úkolem této práce je pomocí klasických morfologických metod (světelná a elektronová mikroskopie) a s použitím metod molekulární fylogenetiky zmapovat diverzitu heteroloboseí

žijících v kyslíkem chudých prostředích a vytvořit základ pro navazující výzkum mitochondriálních derivátů vybraných druhů heteroloboseí. Podstatnou část diplomové práce tvoří i charakterizace nově objeveného anaerobního/mikroaerofilního prvoka s pracovním názvem PC4AM. Ten má unikátní a velmi bizarní morfologii, která jej neumožňuje zařadit ani do konkrétní eukaryotické superskupiny. Je zde diskutována hypotéza, že by mohl patřit mezi Heterolobosea. Skupina Heterolobosea se v posledních letech stává příkladem nesmírně ekologicky, biochemicky i morfologicky diverzifikované linie eukaryot, která si nepochybně zasluhuje větší pozornost.

Cíle práce jsou následující:

1. Získat a dlouhodobě kultivovat co největší množství izolátů heteroloboseí z anoxických a mikrooxických prostředí.
2. Získané izoláty morfologicky charakterizovat s pomocí světelného mikroskopu a připravit případné nové druhy a rody k popisu.
3. Ze získaných izolátů osekvenovat gen pro SSU rRNA a provést jeho fylogenetickou analýzu.
4. U vybraných izolátů představujících samostatné linie heteroloboseí osekvenovat a analyzovat i další geny.
5. Vybrané izoláty pozorovat pomocí transmisního elektronového mikroskopu a popsat jejich buněčnou strukturu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Morfologie a buněčná struktura skupiny Heterolobosea

Z ultrastrukturních studií vyplývá, že mitochondrie příslušníků skupiny Heterolobosea mají ploché (často diskovité) krysty, mnohdy je patrná jejich těsná asociace s drsným endoplasmatickým retikulem. Klasicky vyvinutý (*stacked*) Golgiho komplex chybí a jaderné dělení je uzavřená intranukleární ortomitóza (Page & Blanton 1985). V genomu *N. gruberi* byly nalezeny geny typicky spojené s Golgiho komplexem (Dacks *et al.* 2003), v nějaké podobě tedy tato organela v buňce zřejmě existuje.

Mezi Heterolobosea patří měňavky bez známek mastigontu (např. *Monopylocystis*, *Vahlkampfia*, *Paravahlkampfia*, *Neovahlkampfia*), ale i výhradní bičíkovci s různým počtem bičíků, nejčastěji však se čtyřmi bičíky a se zachovanou exkavátní rýhou (*Percolomonas*, *Pharyngomonas*, *Pleurostomum*, *Lyromonas*). Řada druhů je schopna vytvářet jak stádium měňavky, tak bičíkovce (např. *Naegleria*, *Tetramitus*, *Psalteriomonas*, *Heteramoeba*, *Euplaesiobystra*). Bičíkaté stádium *Psalteriomonas lanterna* nese čtyři exkavátní rýhy, jádra i čtyřbičíkaté mastigonty (Broers *et al.* 1990). Je zajímavé, že některé druhy améboflagelátů při kultivaci ztrácí schopnost tvorby bičíkatého stádia. Toto chování bylo zaznamenáno např. u rodů *Tetramitus*, *Tetramastigamoeba* a *Willaertia* (Page 1988). Je tedy pravděpodobné, že řada druhů heteroloboseí, u kterých se předpokládá absence bičíkatého stádia, ve skutečnosti v přírodě bičíkovce normálně tvoří.

Heterolobosní měňavkovitá stádia jsou válcovitá a jejich pohyb je zpravidla poměrně rychlý. Označují se termínem limax améba, protože jejich lezoucí forma připomíná slimáka (Page & Blanton 1985). Význačnou charakteristikou je přítomnost eruptivních lobopodií, které se obvykle tvoří na přední části buňky. Někdy je vytvářena jediná eruptivní lobopodie, jindy se mohou vytvářet i lobopodie postranní. U některých druhů může být klasická forma limax améby doprovázena i zploštělým, tzv. flabelátním morforem (např. *Stachyamoeba lipophora*) (Page 1988). U rodů *Rosculus* a *Guttulinopsis* tato zploštělá forma dokonce zcela převládá (Page 1988).

2.1.1. Struktura mastigontu

Bičíkatá stádia heteroloboseí mají oproti měňavkám vytvořen mastigont a často i zachovanou **exkavátní rýhu**. Jejich ultrastruktura je proto z fylogenetického hlediska důležitější a lze ji využít například jako zdroj dat pro nezávislé ověření molekulárně – fylogenetických analýz. Na základě ultrastruktury mastigontu je založena i monofylie exkavát jako celku (Simpson 2003).

Dnes známe ultrastrukturu heterolobosních bičíkatých stádií z druhů *Tetramitus rostratus* (Outka & Kluss 1967; Balamuth *et al.* 1983; Brugerolle & Simpson 2004), *Naegleria gruberi* (Dingle & Fulton 1966; Dingle 1970; Larson & Dingle 1981; Brugerolle & Simpson 2004), *Naegleria fowleri* (Patterson *et al.* 1981), *Percolomonas cosmopolitus* (Fenchel & Patterson 1986), *Percolomonas descissus* (Brugerolle & Simpson 2004), *Percolomonas sulcatus* (Brugerolle & Simpson 2004), *Psalteriomonas lanterna* (Broers *et al.* 1990), *Lyromonas vulgaris* (Broers *et al.* 1993), *Pleurostomum flabellatum* (Park *et al.* 2007), *Willaertia magna* (Michel *et al.* 1987) a z morfologicky velmi odvozených bičíkovců druhu *Stephanopogon minuta* (Yubuki & Leander 2008a) a *Stephanopogon apogon* (Lipscomb & Corliss 1982; Patterson & Brugerolle 1988).



Obr. 1: Mastigont *Psalteriomonas lanterna* s charakteristickým harfovitým útvarem tvořeným strukturami MB a MTOR (syn. R1). Vysvětlivky: MB – mikrofibrilární svazek; R – rhizoplast; MTOR – struktura R1; 1, 2, 3, 4 – bazální tělíska bičíků. Převzato z Broers *et al.* 1990.

Porovnáním výsledků studií buněčné struktury heteroloboseí se strukturou buňky ostatních exkavát bylo zjištěno, že Heterolobosea mají zachovány nejméně 3 z 8 ultrastrukturních znaků typických pro Excavata (Simpson 2003). Konkrétně jde o vlastní **exkavátní rýhu**, **fibrilu I** a **R1 rozdělené na vnitřní a vnější část (R1l a R1r)**.

Struktura R1 (syn. MTOR, obr. 1) je přitom páska organizující mikrotubuly, které podpírají exkavátní rýhu. Nachází se v těsné blízkosti bazálního tělíska 1. bičíku. Mikrotubuly se z ní rozcházejí do dvou stran a vznikají tak

R1l a R1r vyztužující stěny exkavátní rýhy. **Fibrila I** je obvykle přiložena na vnitřní straně R1, a to v jeho nejpřednější části.

Pokud se týká dalších cytoskeletárních struktur v buňce heteroloboseí, dvojice mikrotubulů vycházející z báze 2. bičíku u *Psalteriomonas lanterna* by mohla být homologická se strukturou R4, která je vytvořena u mnoha exkavátních linií s konzervativní strukturou mastigontu (např. skupina Jakobida, *Carpediemonas*, *Trimastix*) (Simpson 2003). Brugerolle a Simpson (2004) spekulují také o přítomnosti přeměněné fibrily B, která je jedním z 8 unikátních ultrastrukturních exkavátních znaků. Podle těchto autorů je s fibrilou B v buňce heteroloboseí homologický **mikrofibrilární řetězec S** nalezený v buňce *Percolomonas descissus*, *Lyromonas vulgaris* a *Psalteriomonas lanterna*. Například u druhu *Percolomonas descissus* vychází tato struktura z R1l blízko předního konce exkavátní rýhy a prochází šikmo jejím dnem, aby podložila pravou část exkavátní rýhy (Brugerolle & Simpson 2004).

Další důležitou strukturou přítomnou v buňkách heteroloboseí je **rhizoplast (obr. 1)**, což je velká žíhaná fibrila, která může být výrazně prodloužena, takže vypadá jako prut (např. rod *Naegleria*) a může být dokonce i mnohonásobně rozvětvena (např. *Tetramitus rostratus*). Spekuluje se o její homologii s fibrilou A, která zaujímá podobnou pozici v buňkách některých jiných skupin exkavát, například jakobidů (Brugerolle & Simpson 2004).

Kromě těchto struktur se v buňce heteroloboseí nachází i **koš dorzálních mikrotubulů**, který se podílí na zpevnění boků a dorzální části buňky, popřípadě podpírá nápadné **rostrum**, jenž je vytvořeno např. u druhu *Tetramitus rostratus* a *Pleurostomum flabellatum*. Významnou strukturou je i **mikrofibrilární svazek (MB, obr. 1)**. Zřejmě jen u bičíkatých zástupců anaerobní linie vytváří jeho spojení s kořeny 1. a 4. bičíku na jednom konci a R1 na konci opačném charakteristický harfovitý útvar, viz **obr. 1** (Broers *et al.* 1990). Tento útvar byl zaznamenán i u druhu *Percolomonas descissus* (Brugerolle & Simpson 2004).

Velmi důležitá je i **struktura R1'**, která se různou měrou spolupodílí na vyztužování exkavátní rýhy. Bylo zjištěno, že R1 je vždy spojeno s bazálním tělískem nejstaršího bičíku a R1' s bazálním tělískem 2. nejstaršího bičíku (Brugerolle & Simpson 2004). U heteroloboseí tedy podobně jako u některých jiných skupin eukaryot dochází k **ciliární transformaci** (role bičíku se mění podle jeho stáří). Po dělení se v každé dceřiné buňce dotváří 3. a 4. bičík *de novo*. Jedna dceřiná buňka si přitom bere nejstarší (1.) a jeden z nejmladších bičíků (3.) mateřské buňky, které se v ní stávají 1. a 2. bičíkem. Druhá dceřiná buňka si z mateřské

buňky bere 2. a 4. bičík, jež se v ní transformují také na 1. a 2. bičík. Bičíky se přitom u čtyřbičíkatých heteroloboseí (dokázáno u *Percolomonas sulcatus*) organizují do dvou párů, přičemž jeden pár je tvořen 1. a 4. bičíkem, druhý pár pak 2. a 3. bičíkem (Brugerolle & Simpson 2004).

Zajímavé je, že zatímco R1 u heteroloboseí podpírá levý bok exkavátní rýhy, u ostatních exkavát tuto roli plní struktura R2, která u heteroloboseí chybí. R1 naproti tomu u ostatních exkavát probíhá dnem exkavátní rýhy (Brugerolle & Simpson 2004).

Většina studovaných heterolobosních bičíkovců má exkavátní rýhu jdoucí podél těla jako široký žlábek. Existují však dvě dobře prozkoumané výjimky, druhy *Tetramitus rostratus* a *Pleurostomum flabellatum*. U druhu *Tetramitus rostratus* je otevřená část exkavátní rýhy poměrně kratší, neboť pokračuje do buňky jako mikrotubulárně vyztužený trubicovitý útvar (Balamuth *et al.* 1983). Trubicovitý cytostom s širokým ústím je přítomen také u druhu *Pleurostomum flabellatum*. Stejně jako u jiných heteroloboseí, je cytostom i u tohoto druhu vyztužen strukturou R1 rozdělenou do dvou částí. Většina mikrotubulů podporujících cytostom ovšem vychází spíše z rostra než z děleného R1 (Park *et al.* 2007).

Brugerolle a Simpson (2004) upozorňují, že mastigont čtyřbičíkatých heteroloboseí má spíše charakter **dvojice vývojově propojených jednotek** (dikinetid), nežli jedné jednotky (tetrakinetidy). Nejnápadnější je tato situace u druhu *Percolomonas sulcatus*, který má dva páry bičíků umístěných bok po boku, nikoliv jeden za druhým nebo v pravém úhlu vůči sobě (Brugerolle & Simpson 2004).

2.1.2. Transformace měňavky na bičíkaté stádium u druhu *Naegleria gruberi*

Proces přeměny měňavky na bičíkovce byl pozorován u několika druhů heteroloboseí (kromě příslušníků rodu *Naegleria* například také u druhu *Trimastigamoeba phillipiensis* (Bovee 1959), skutečně detailně je ale popsán u druhu *Naegleria gruberi* (souhrn např. Lee 2010).

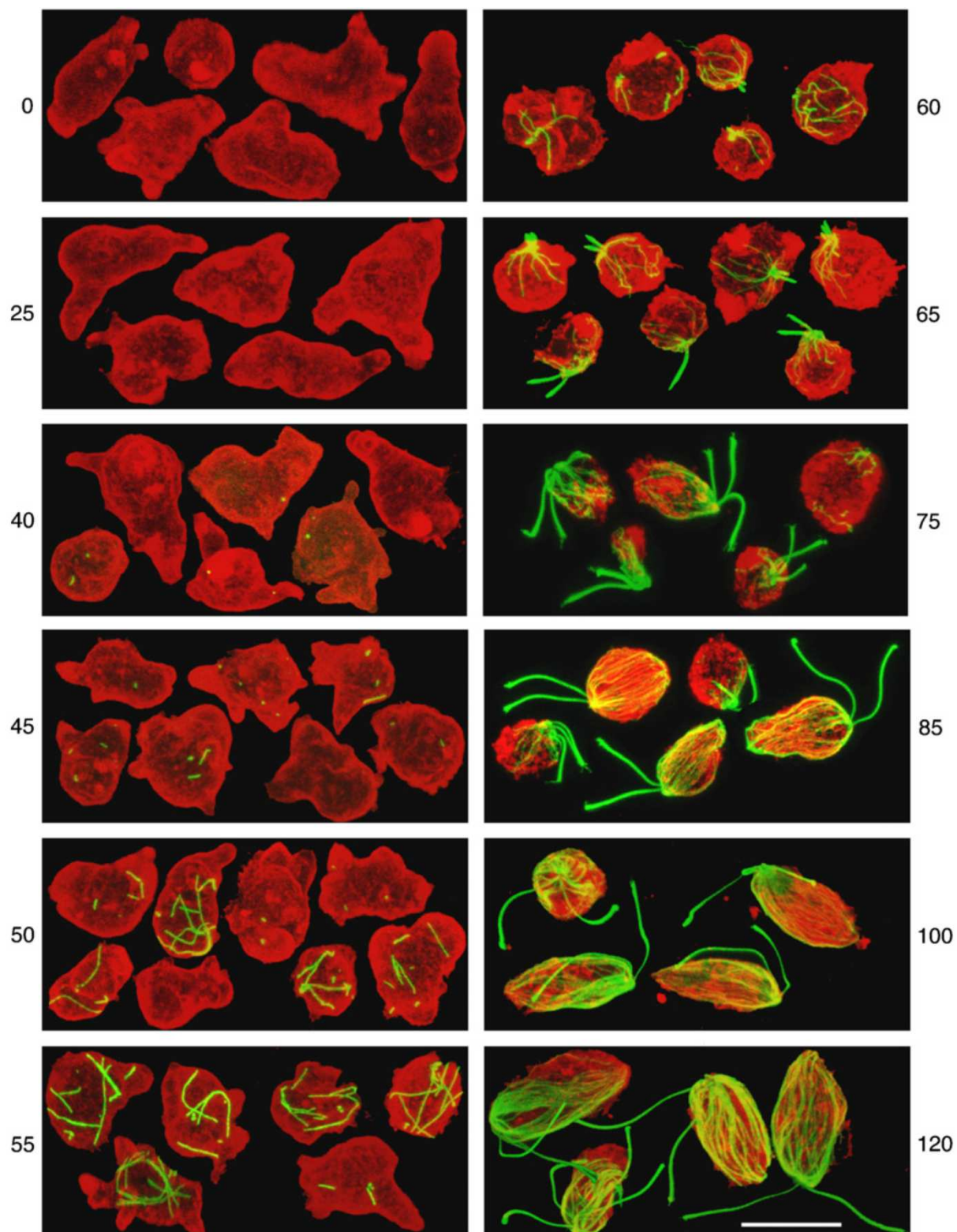
Naegleria gruberi při transformaci mění svůj tvar z amorfního měňavkovitého stádia na rigidní buňku bičíkovce. Celý proces trvá pouze 120 minut a zahrnuje tvorbu bičíkatého aparátu (mastigontu) *de novo* (např. Fulton & Dingle 1971; Lee 2010). Zralý mastigont bičíkovce je složen z dvojice bazálních tělísek bičíků, dvojice axonem bičíků a řady přidružených cytoskeletárních útvarů (viz **kap. 2.1.1.**).

Tvorba bazálních tělísek *de novo* během života buňky není unikátní pro Heterolobosea, byla popsána též u řady jiných skupin mnohobuněčných i jednobuněčných eukaryot. Konkrétním příkladem může být vodní kapradina marsilka (Hepler 1976), ale i někteří živočichové – octomilka (Riparbelli a Callaini 2003) nebo myš (Calarco-Gillam *et al.* 1983). Studium tohoto fenoménu je ale obvykle extrémně obtížné kvůli malému množství dostupných buněk (a tím i sledovaných proteinů) využitelných v experimentu. Z tohoto důvodu je *N. gruberi* ideálním modelovým organismem, v laboratoři lze totiž vyvolat synchronizovanou diferenciaci u zhruba 95 % populace buněk najednou (Lee 2010).

Proces diferenciaci měňavkovitého stádia *Naegleria gruberi* na bičíkaté může být spouštěn několika různými faktory prostředí, například snížením teploty, třepáním, hladověním nebo nízkou koncentrací iontů (Lee 2010). Lze tedy shrnout, že **tvorba bičíkatého stádia je reakcí na nepříznivé podmínky vnějšího prostředí**. Stádium bičíkovce totiž umožňuje přesun organismu na vhodnější stanoviště. Bylo prokázáno, že bičíkovec druhu *N. gruberi* může putovat k povrchové blance vody, kde se přichytí a přemění se na měňavku. Ta se po povrchové blance pohybuje a požírá bakterie (Preston & King 2003).

Na začátku diferenciaci v bičíkovce zastavují měňavky améboidní pohyb a zakulacují se. Pak se objevuje pár krátkých bičíků a buňky se prodlužují do konečného tvaru. Bičíky se pomalu prodlužují, a to až na délku 15 μm . Dochází k přeskupování aktinových filament (Walsh 2007) a nakonec se také fixuje jádro v oblasti přední části buňky (Fulton & Walsh 1980). *Naegleria gruberi* může ve stavu bičíkovce přetrvat několik minut, hodin, ale i dní (Lee 2010). Protože v této fázi není schopna dělení ani příjmu potravy, musí časem dojít ke zpětné diferenciaci bičíkovce na měňavku. Díky tomu může pokračovat buněčný růst. Během zpětné diferenciaci na měňavkovité stádium ztrácí bičíkovec pravidelný tvar, vzniká forma améby s bičíky. Bičíky pak ztrácí schopnost pohybu a jsou resorbovány do těla buňky (Fulton 1977).

Proces přeměny měňavky v bičíkovce je zachycen na **obr. 2**. U měňavkového stádia hraje zásadní roli aktinový cytoskelet, u bičíkatého stádia se objevuje i bohatá mikrotubulární kostra (Walsh 2007). Neznamená to ale, že by došlo k prostému přesmyku z aktinového na mikrotubulární cytoskelet. Tvorba mikrotubulárního cytoskeletu je naopak spojena nejen se specifickou genovou expresí, ale i s existencí neporušeného aktinového kortexu (Lee 2010). Předpokládá se, že aktinová kostra hraje důležitou roli v pohybu mRNA, jejímž překladem vznikají mikrotubulární proteiny (Han *et al.* 1997).



Obr. 2: Transformace měňavkovitého stádia *Naegleria gruberi* na bičíkovce. Čísla po stranách udávají čas v minutách od iniciace přeměny. V buňkách byl pomocí protilátek označen aktin (červeně) a α -tubulin (zeleně). Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu, poté byly složeny jednotlivé řezy buňkami. Měřítka znamená 10 μ m. Převzato z Walsh 2007.

Protilátkově detekovatelný α -tubulin buněčného cytoskeletu se objevuje po cca 40 – 45 minutách od zahájení diferenciaci měňavky v bičíkovce, a to ve formě dvou „skvrn“. Tyto skvrny jsou asociovány s povrchovým aktinovým cytoskeletem. Po dalších 5 – 10 minutách se v buňkách objevují cytoplasmatické mikrotubuly. Děje se tak ještě před vytvořením zřetelných bazálních tělísek. Přinejmenším jeden konec těchto mikrotubulů je napojen na povrchový aktinový cytoskelet. Záhy poté začínají být viditelná i bazální tělíska. Bičíky se vytvářejí po 65 – 75 minutách od počátku diferenciaci a pomalu rostou do konečné délky. Spolu s nimi rostou směrem do cytoplasmy i mikrotubuly, jež vychází z oblasti bazálních tělísek. Dochází k prodlužování buněk a zároveň ubývají mikrotubuly volně ležící v cytoplasmě. Není jasné, zda tyto volné mikrotubuly zanikají, nebo zda jsou odvedeny do oblasti bazálních tělísek. Na konci diferenciaci je pak pomocí kořínek bičíků zafixováno jádro v přední části buňky (Walsh 2007).

Spekuluje se o existenci zvláštní organely, jež usnadňuje vytvoření komplexu proteinů (tzv. GTS), který hraje zásadní roli při skládání bazálních tělísek bičíků. Do blízkosti tohoto komplexu se pak v další fázi díky aktinovému cytoskeletu dostávají mRNA proteinů důležitých pro stavbu bičíku a cytoplasmatických mikrotubulů a dochází k tvorbě mastigontu. Tato organela však nebyla doposud nikdy pozorována (Lee 2010).

2.1.3. Mnohobuněčná stádia

Nejnámějším zástupcem mnohobuněčných heteroloboseí je bezesporu rod *Acrasis*. Zahrnuje organismy, které jsou v jednobuněčné formě měňavkovité, ale umí tvořit i mnohobuněčné plodničky. Spóry přitom na sorokarpu vytváří jednoduché či větvené řetězce. Sorokarpy jsou růžové nebo tmavě fialové a bičíkatá stádia nejsou doposud známa. Rod *Acrasis* je z mnohobuněčných heteroloboseí také jediný, u něhož jsou k dispozici publikovaná sekvenční data, a to u druhů *Acrasis rosea* a *Acrasis helenhemmesae* (Brown *et al.* 2010). Při tvorbě plodničky dochází u rodu *Acrasis* k nahromadování dříve samostatně žijících buněk. V tomto způsobu zakládání mnohobuněčného těla se značně podobá rodu *Dictyostelium* (superskupina Amoebozoa). Vlastní agregace buněk má ale jiný průběh. Zatímco u rodu *Acrasis* se k agregačnímu centru buňky pohybují jednotlivě či v malých skupinkách, u rodu *Dictyostelium* se buňky pohybují v proudech (Olive 1970). Buňky *Acrasis rosea* neodpovídají ani na přítomnost cAMP, který je signálem pro začátek shlukování a tvorby mnohobuněčné

fáze u rodu *Dictyostelium*. Chybí též stádium „slimáka“, to ovšem netvoří ani někteří diktyosteliidi (Bonner 2003).

Na základě morfologické podobnosti se do skupiny Heterolobosea a do blízké příbuznosti rodu *Acrasis* řadí i mnohobuněčné rody *Pocheina* a *Guttulinopsis*. Přinejmenším u rodů *Acrasis* a *Pocheina* nedochází k odumírání buněk při tvorbě plodničky (Olive & Stoianovitch 1960; Olive 1970).

Rody *Pocheina* a *Acrasis* jsou si morfologicky velmi podobné, rod *Guttulinopsis* je od nich naopak v řadě znaků odlišný. Jednotlivé buňky, respektive malé skupiny buněk, v plodničce *Guttulinopsis* jsou navzájem odděleny sítí extracelulárních filament (Erdos & Raper 1978). Mitochondrie *Guttulinopsis* obsahují zvláštní helikální inkluze a nejsou obklopeny drsným endoplasmatickým retikulem (Dykstra 1977). Liší se i ve způsobu uložení encystovaných buněk a stěna spor *Guttulinopsis* je bilaminární.

Z hlediska evoluce kmene Heterolobosea je důležité, jsou-li solitérní buňky druhů s mnohobuněčným stádiem vždy měňavkovité, nebo jestli i zde existují bičíkovci, podobně jako u jiných linií heteroloboseí. Ultrastruktura takových bičíkovců totiž skýtá nezávislý zdroj znaků odkazující na fylogenetickou pozici akrasií a jejich příbuzných uvnitř heteroloboseí. Z tohoto pohledu je významný druh *Pocheina flagellata*, který je za určitých okolností schopen vytvářet bičíkatou formu se dvěma bičíky a potravní rýhou. Byly u něj zaznamenány i čtyřbičíkaté dvoujaderné buňky, které se později dělí na dva dvoubičíkaté jedince (Olive *et al.* 1983). Buněčná struktura těchto bičíkovců však dosud nebyla zkoumána.

2.2. Ekologie skupiny Heterolobosea

Heterolobosea můžeme najít v nejrozličnějších prostředích bohatých na bakterie, neboť se jedná převážně o bakteriovorní organismy. Najdeme je v půdě, ve vodě či vodních sedimentech. Nepřekvapí nás proto, že jsou mezi nimi i anaerobní a mikroaerofilní druhy (např. O'Kelly *et al.* 2003).

Skutečně významnou ekologickou roli hrají v extrémně slaném prostředí, kde tvoří okolo třetiny pozorovaných morfospecií (odhad Park *et al.* 2009). Do tohoto prostředí pronikla Heterolobosea minimálně třikrát nezávisle na sobě, a to v liniích *Pharyngomonas* (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008), *Pleurostomum-Tulamoeba* (Park *et al.* 2007; Park *et al.* 2009)

a *Euplaesiobystra* (Park *et al.* 2009). U rodů *Pleurostomum*, *Tulamoeba* a *Euplaesiobystra* bylo experimentálně prokázáno, že jde o obligátní halofily, kteří v kultuře nepřežijí salinitu nižší než 75 ‰ (Park *et al.* 2007; Park *et al.* 2009). Průměrná salinita mořské vody je přitom 36 ‰.

Dalším prostředím, které má extrémní parametry a obývají jej Heterolobosea jsou extrémně kyselé habitaty ($\text{pH} < 3$). Jedním z důležitých doprovodných faktorů, se kterým se musí acidofilní organismy vyrovnat, je vysoká koncentrace rozpuštěných kovů. Kovy se zde mohou uvolňovat přímo oxidací sulfidových minerálů, působením bakterií nebo zvětráváním hornin v důsledku působení extrémně kyselé vody. Pro heterotrofní prvky je extrémně kyselé prostředí přesto velmi lákavé, protože je zde nízká konkurence a obrovské množství potravy. Primární produkce je zajišťována zejména bakteriemi oxidujícími síru a železo (Johnson 1998).

Kupodivu i extrémně kyselému prostředí se Heterolobosea přizpůsobila opakovaně, minimálně třikrát nezávisle na sobě. Linii heteroloboseí blízce příbuznou rodu *Paravahlkampfia* našli Amaral-Zettler *et al.* (2002) při výzkumu organismů žijících v Río Tinto (Španělsko), a to při hodnotě pH 2,0. Extrémně acidofilního příslušníka rodu *Naegleria* identifikovali Sheehan *et al.* (2003) v oblasti Nymph Creek (USA). Hodnota pH na studované lokalitě byla 2,7. V obou zmiňovaných případech šlo ale pouze o zachycení sekvencí (sekvence jsou uloženy v databázi GenBank pod názvy AY082995 a AY268958). Naproti tomu druh *Tetramitus thermacidophilus* byl z extrémně kyselého prostředí dokonce vykultivován a charakterizován (Baumgartner *et al.* 2009). Optimum růstu má v pH 3, ale přežívá pH 1,2 – 5. Autoři ho zachytili na dvou geograficky vzdálených lokalitách (Itálie, Kamčatka). Nové sekvence SSU rDNA patřící heteroloboseím přinesla další studie mikrobiálních společenstev v Río Tinto (Amaral-Zettler *et al.* 2011). Autoři neprovedli detailní fylogenetickou analýzu těchto sekvencí, vlastní analýzu jejich fylogenetické pozice proto uvádím ve výsledcích (označeny jako O127706C02 a B334706F06).

Prvoci řazení mezi Heterolobosea mají také poměrně široké spektrum teplotních nároků. Z dostupných dat je zřejmé, že k přizpůsobení teplotám nižším než 15 °C a vyšším než 40 °C došlo u heteroloboseí opakovaně. Nejtermofilnější eukaryota mají maximální růstovou teplotu kolem 60 °C (Rothschild & Mancinelli 2001). *Tetramitus thermacidophilus*, snad nejtermofilnější známý zástupce heteroloboseí, dokáže růst při 54 °C (Baumgartner *et al.*

2009). *Vahlkampfia signyensis* je příkladem opačného pólu teplotních nároků heteroloboseí, růstového optima dosahuje při 10 °C a prosperuje i ve 4 °C (Garstecki 2005). Zajímavé je, že v rámci rodu *Tetramitus*, do něhož patří nejtermofilnější známý heterolobosean, byl popsán i druh *Tetramitus vestfoldii*. Tento druh byl izolován ze slané jezera v Antarktidě a pěstován při 5 °C (Murtagh *et al.* 2002).

V rámci kmene Heterolobosea se setkáváme také s několika druhy, které jsou endobiotické a v některých případech mohou dokonce příležitostně parazitovat v tělech živočichů a výjimečně i člověka. Nejznámějším příkladem je *Naegleria fowlerii*, která je původcem smrtelného onemocnění člověka (souhrn např. Visvesvara *et al.* 2007).

2.3. Anaerobní zástupci heteroloboseí

***Psalteriomonas lanterna* Broers, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1990**

Améboflagelát, který je na základě sekvence genu pro SSU rRNA blízce příbuzný rodům *Monopylocystis* a *Sawyeria* (např. O'Kelly *et al.* 2003; Park *et al.* 2009). Byla publikována EST studie zaměřená na jeho anaerobní metabolismus (De Graaf *et al.* 2009, viz **kap. 2.4**).

Obývá sladkovodní sedimenty (izolován z čističky odpadních vod v Holandsku). Stádium cysty nebylo zaznamenáno. Stádium bičíkovce má obvykle vytvořeny čtyři exkavátní rýhy o délce 2/3 buňky, 4 kompletní mastigonty (v každém 4 bičíky) a 4 jádra. Jádra jsou umístěna v přední části buňky, jejich jádérko je centrální. Jadérko přetrvává během mitózy a dělí se na dva polární shluky. Bičíky jsou zhruba stejně dlouhé, asi 1,5x delší než buňka. Velikost těla bičíkovce je přibližně 15 x 25 µm. Ve středu buňky je umístěna velká granule o průměru asi 7 µm (Broers *et al.* 1990). Tato granule obsahuje asociované shluky mitochondriálních derivátů bez krist (asi 20 nebo víc). Mezi mitochondriemi v této granule jsou také methanogenní bakterie (Broers *et al.* 1990; De Graaf *et al.* 2009). Kromě toho je v buňce přítomna ještě druhá morfa mitochondrie bez krist, která je soliterní a obklopena drsným endoplasmatickým retikulem (Broers *et al.* 1990; De Graaf *et al.* 2009). Mitochondriální deriváty *P. lanterna* je možné označit jako hydrogenosomy (De Graaf *et al.* 2009). Každý ze čtyř mastigontů bičíkovce je charakteristický strukturou připomínající **harfu** („*psalterium*“). Jde o obrazec patrný na příčném řezu skrze strukturu R1 a připojený svazek mikrofilament (MB). Améba nemá žádné stopy po mastigontu. Je zajímavé, že *Psalteriomonas lanterna* má

jako jediný dosud studovaný zástupce heteroloboseí na svých bičících ploutvičky (Broers *et al.* 1990).

Měňavka má podobu klasické limax formy s eruptivními lobopodiemi. Jak stádium měňavky, tak bičíkovce se mitoticky dělí. Transformaci bičíkovců do stádia améby lze vyvolat přidáním kyslíku na 1,5% koncentraci (Broers *et al.* 1990), transformace améb zpět do bičíkatých stádií byla však neúspěšná. Améby zřejmě ztrácí endobiotické bakterie, shluky mitochondriálních derivátů neasociovaných s RER jsou však ve struktuře buňky stále jasně patrné. Nachází se v blízkosti jádra (Broers *et al.* 1990).

***Sawyeria marylandensis* O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003**

Jedná se o klasickou limax amébu s eruptivními panožkami. Na základě sekvence genu pro SSU rRNA je blízcě příbuzná druhu *Psalteriomonas lanterna* (např. O'Kelly *et al.* 2003; Park *et al.* 2009). Byla publikována EST studie zaměřená na její anaerobní metabolismus (Barberà *et al.* 2010, viz **kap. 2.4**).

Obývá sladkovodní sedimenty (izolována z prostředí bohatého na železo). Průměrná délka těla lokomotivní formy je 31,4 µm, průměrná šířka 8,1 µm. Průměrný poměr délky těla vůči šířce je 3,9. Nepohyblivé se, přisedlé buňky mají vždy kruhový obrys. Plovoucí améby jsou kulovité, bez paprscitých panožek. Bičíkaté stádium a stádium cysty není známo (O'Kelly *et al.* 2003). Buňky jsou jednojaderné. Jádro je obvykle kulovité či mírně elipsoidní. Obsahuje jedno nebo dvě periferní jadérka, která jsou umístěna v lalocích jádra a přitisklá na jadernou membránu. Jádro je v interfázi těsně obklopeno drsným endoplasmatickým retikulem, které jej celé obepíná. Mitochondriální deriváty nemají viditelné kristy, je možné je označit jako hydrogenosomy (Barberà *et al.* 2010). Na povrchu buňky není patrný žádný glykokalyx (O'Kelly *et al.* 2003).

***Monopylocystis visvesvarai* O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003**

Limax améba s eruptivními panožkami (O'Kelly *et al.* 2003). Na základě sekvence genu pro SSU rRNA je blízcě příbuzná linii *Psalteriomonas-Sawyeria* (např. O'Kelly *et al.* 2003; Park *et al.* 2009).

Obývá slané habitaty (izolována ze sedimentu slaniska v USA). Průměrná délka těla lokomotivní formy je 22,0 µm, průměrná šířka 8,0 µm. Průměrný poměr délky těla vůči šířce je 2,7. Nepohyblivé se, přisedlé buňky mají kruhovitý obrys. Plovoucí améby jsou kulovité,

bez paprscitých panožek. Bičíkaté stádium není známo. Tenkostěnné cysty kulovitého tvaru, s jedním pórem, bez ornamentování a mineralizace (O'Kelly *et al.* 2003). Buňky jsou jednojaderné. Jádru má nepravidelný, mnohoúhelníkovitý obrys. Jadérko má podobu tenké vrstvy a je přitisklé na jadernou membránu. Jádru je obvykle těsně obklopeno drsným endoplasmatickým retikulem, ale netvoří kompletní obálku jádra. Mitochondriální deriváty bez viditelných krist (O'Kelly *et al.* 2003).

***Vahlkampfia anaerobica* Smirnov & Fenchel, 1996**

Limax améba s eruptivními panožkami. Obývá mořské sedimenty. Uroid je často přítomen, vytváří se uroidální filamenty nebo baňatý uroid (Smirnov a Fenchel 1996). Fylogenetická pozice neznámá, ale může jít o další druh rodu *Monopylocystis* (O'Kelly *et al.* 2003). Průměrná délka těla měňavky je 23 μm , průměrná šířka 7 μm . Průměrný poměr délky těla vůči šířce mezi 2,8 – 3,8 v závislosti na kultuře. Plovoucí forma má 1 – 7 tlustých, kuželovitých a paprskovitých panožek, z nichž nejdelší je až 2x delší než je průměr centrální části buňky. Sousedící panožky často vychází ze stejného místa. Bičíkaté stádium a stádium cysty neznámé. Test transformace na bičíkaté stádium nebyl prováděn (Smirnov & Fenchel 1996).

Jádru obvykle zakulacené, ale jeho tvar se může během pohybu měňavky měnit. Jadérko má podobu tenké vrstvy na okraji jádra. Drsné endoplasmatické retikulum je dobře viditelné a v těsném kontaktu s jádrem. Stažitelná vakuola chybí. Mitochondriální deriváty zřejmě bez krist, nebyla pozorována jejich asociace s drsným endoplasmatickým retikulem. Na povrchu buňky se nachází tenký glykokalyx. Uvnitř buňky jsou často přítomné bakterie, které nejsou nikterak místně asociovány s mitochondriálními deriváty. Nebyly zaznamenány žádné stopy po mikrotubulech a mikrofilamentech (Smirnov & Fenchel 1996).

***Lyromonas vulgaris* Broers, Meijers, Symens, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1993**

Sladkovodní bičíkovec izolovaný z anaerobního sedimentu v Holandsku. Cysty ani měňavková stádía nebyla pozorována. Buňka o variabilní šířce 6 – 8 μm a o konstantní délce 12 μm , s jemně zúženým zadním koncem těla. Ojediněle pozorovány i obří buňky o velikosti 30 – 40 μm . Čtyři bičíky zhruba stejné délky, vychází z buňky pod vrcholem. Exkavátní rýha dosahuje délky 2/3 buňky. Struktura mastigontu téměř identická s druhem *Psalteriomonas lanterna*, ale buňka nese pouze jediný mastigont, jedno jádro a exkavátní rýhu (Broers *et al.* 1993).

Buňka je jednojaderná, jádro leží v její horní polovině. Blízko něj se nachází shluk mitochondriálních derivátů (bez krist) a methanogenních bakterií, obdobně jako u druhu *Psalteriomonas lanterna*. V některých buňkách tyto shluky obsahují jednu nebo dvě velké vakuoly neznámé funkce (Broers *et al.* 1993).

***Percolomonas descissus* Perty, 1852**

Sladkovodní bičíkovec (Klug 1936; Brugerolle & Simpson 2004), který byl zaznamenán i v brakickém prostředí mangrovů (Bernard *et al.* 2000). Cysty nebyly pozorovány, měňavkovitá stadia se 4 bičíky jsou známa pouze z jediné kresby (Klug 1936), ale v ostatních pracech nebyla popisována (viz Perty 1852; Bernard 2000; Brugerolle & Simpson 2004). Buňka bičíkovce má variabilní šířku i délku. Buňky jsou průměrně 15 µm dlouhé (Bernard *et al.* 2000), respektive 10 – 30 µm dlouhé a 6 – 18 µm široké (Klug 1936). Tvar buňky může být vejčitý, hruškovitý nebo protáhlý (Bernard *et al.* 2000), s jemně zúženým zadním koncem těla (Klug 1936; Brugerolle & Simpson 2004). Buňky tohoto prvoka nesou čtyři bičíky, z nichž jeden je nápadně delší než ostatní a 1,5 – 3x delší než buňka. Ostatní bičíky jsou o délce 75 – 100 % délky buňky (Bernard *et al.* 2000; Brugerolle & Simpson 2004). Ve stresových podmínkách se buňky stávají hruškovitými a ztrácí zúžení na zadním konci těla (Brugerolle & Simpson 2004). Žádný bičík nenese ploutvičku (Bernard *et al.* 2000). Exkavátní rýha dosahuje délky 1/3 až 1/2 buňky. Struktura mastigontu je téměř identická s druhem *Psalteriomonas lanterna* a *Lyromonas vulgaris*, ale velmi podobná je i druhu *Percolomonas cosmopolitus* (Brugerolle & Simpson 2004). Přítomen je jediný mastigont, jedno jádro a exkavátní rýha. Fylogenetická pozice není známa, předpokládá se příslušnost k rodu *Percolomonas* (Brugerolle & Simpson 2004).

Jediné jádro s jadérkem rozděleným do několika okrsků umístěných na jeho okraji. Mitochondriální deriváty bez krist (Brugerolle & Simpson 2004).

***Pleurostomum flabellatum* Ruinen, 1938**

Bičíkovec se dvěma bičíky přibližně stejné délky (1,5 – 2x delší než buňka). Buňka je 10 – 14 µm dlouhá. Cytostom má široké ústí, ale pokračuje jako trubice spirálovitě se stáčející až do poloviny délky buňky. V mnoha, ale ne ve všech buňkách, jsou, kromě dvou bazálních tělísek pokračujících axonem, ještě dvě bazální tělíska bez axonem (Park *et al.* 2007). Některé buňky na zadním konci vytváří jemný cytoplasmatický výběžek. Jádro s centrálním

nukleolem. Mitochondrie pravděpodobně nemají krysty, je to obligátně halofilní druh (optimální salinita 313 ‰ a teplota 40 °C). Důvodem přeměny mitochondrií může být poměrně nízký obsah kyslíku v teplé a extrémně slané vodě. Obsah kyslíku je zde asi 3x nižší než v běžné mořské vodě (Park *et al.* 2007).

2.4. Anaerobní mitochondrie heteroloboseí a její specifika

Známe řadu eukaryot schopných obligátního anaerobního nebo mikroaerofilního způsobu života (*Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* apod). V posledních letech se množí ale i studie, které odhalují schopnost některých prvoků za určitých okolností přepnout z klasického aerobního metabolismu na anaerobní. Například u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* byla prokázána schopnost přepnout na anaerobní metabolismus produkující ATP za vzniku vodíku (Mus *et al.* 2007).

Pro tuto práci je podstatné, že některé enzymy typické pro anaerobní metabolismus byly nalezeny též v genomu *Naegleria gruberi* (Fritz-Laylin *et al.* 2010). Předpokládá se, že je *N. gruberi* schopna za určitých okolností přejít z klasické dráhy oxidativní fosforylace na anaerobní produkci ATP. Tuto domněnku nepodporují jen genomická data, ale i pozorování. *Naegleria* je totiž nacházena nejen v oxických, ale též v mikrooxických prostředích a v laboratoři ji lze pěstovat v mikroaerofilních podmínkách (v polyxenické kultuře, nikoliv axenicky – Ginger *et al.* 2010)¹.

Sekvence mitochondriálního a jaderného genomu *N. gruberi* ukazuje na přítomnost funkčního, na kyslíku závislého mitochondriálního dýchacího řetězce a Krebsova cyklu (Ginger *et al.* 2010). Jediným náznakem anaerobního metabolismu byl v minulosti objev PP_i dependentní fosfofruktokinázy u *N. fowleri* (Wessberg *et al.* 1995). Osekvenování jaderného genomu *N. gruberi* NEG-M (41 Mb) však přineslo další, zásadní data (Fritz-Laylin *et al.* 2010; <http://genome.igi-psf.org/Naegr1.home.html>). Byly totiž objeveny také geny pro FeFe-hydrogenázu a homology HydE, HydF a HydG (Fritz-Laylin *et al.* 2010). Navíc je pravděpodobné, že tyto proteiny mají cílovou lokalizaci právě v mitochondriích (mitochondriální cílová sekvence). Tyto předpoklady bude nutné experimentálně ověřit, ale zdá se, že *Naegleria gruberi* představuje poměrně vzácný příklad heterotrofního prvoka,

¹ Blíže neurčený druh rodu *Naegleria* byl půl roku pěstován v anaerostatu i v naší laboratoři.

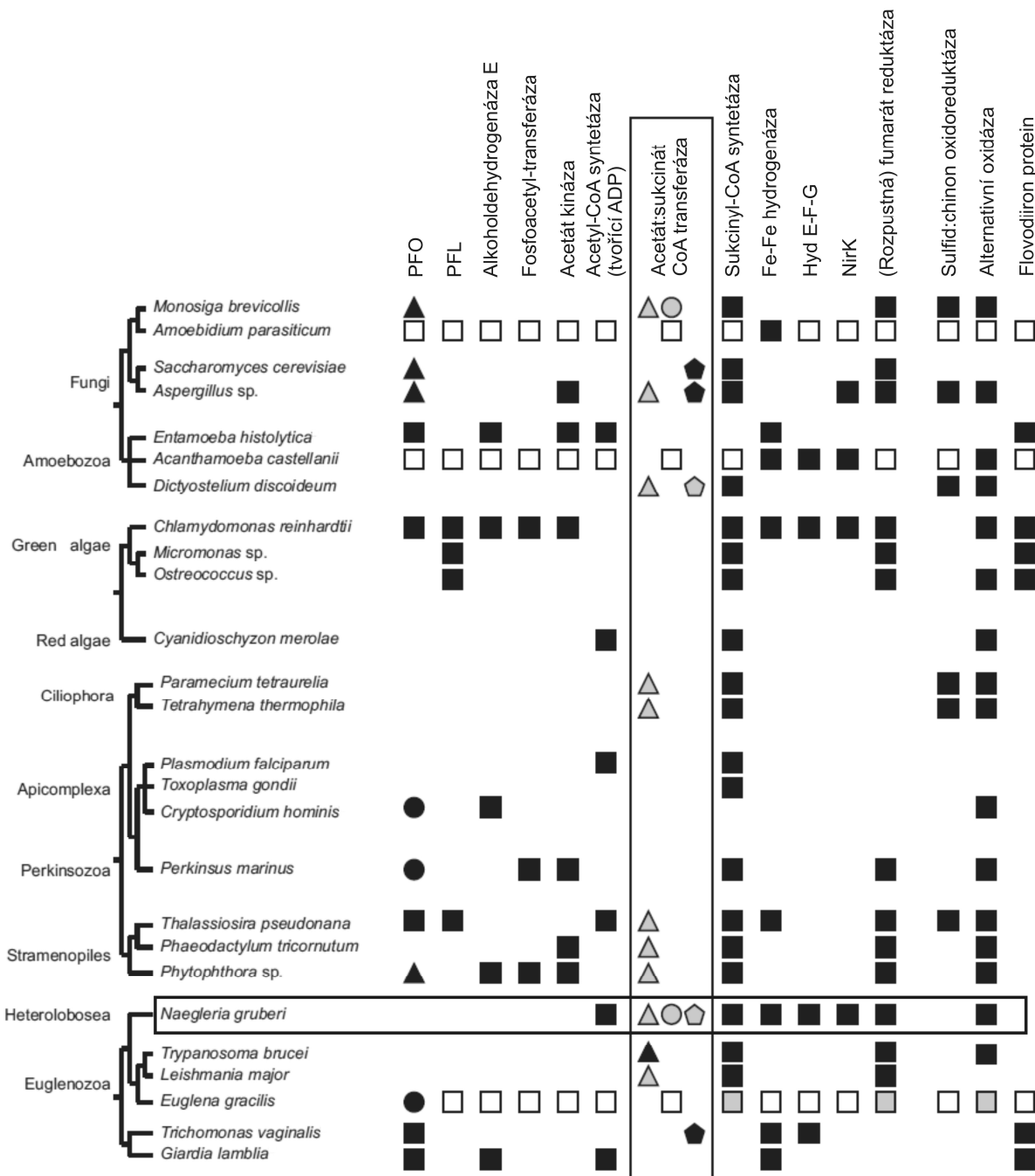
jehož mitochondrie jsou schopny oxidativní fosforylace i anaerobní produkce ATP za vzniku molekulárního vodíku (Ginger *et al.* 2010). V genomu *N. gruberi* na druhou stranu chybí jiný typický enzym pro anaerobní produkci ATP, pyruvát:ferrodoxin oxidoreduktáza (PFO), což je enzym dekarboxylující pyruvát na acetyl-CoA a současně přenášející elektrony na ferrodoxin (nahrazuje tedy enzym pyruvát dehydrogenázu přítomnou v klasických mitochondriích – více např. Hrdy & Müller 1995). U některých anaerobních eukaryot je místo PFO pyruvát:NADP oxidoreduktáza (PNO; např. Rotte *et al.* 2001), popřípadě pyruvát formát lyáza (PFL; např. Akhmanova *et al.* 1999). Ani ony však v genomu *N. gruberi* nalezeny nebyly (Ginger *et al.* 2010). Kompletní přehled enzymů spojených s anaerobním energetickým metabolismem nalezených v genomu *N. gruberi* je na **obr. 3**.

Kromě genomového projektu *N. gruberi* byly v posledních dvou letech provedeny též analýzy EST z příslušníků anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae). Z typového izolátu druhu *Psalteriomonas lanterna* bylo získáno 480 EST (De Graaf *et al.* 2009), ze *Sawyeria marylandensis* 9300 EST (Barberà *et al.* 2010). Jak u r. *Psalteriomonas* tak u r. *Sawyeria* byla nalezena PFO. Zajímavé je, že FeFe hydrogenáza má u *Psalteriomonas* a *Sawyeria* jednotný původ, není ale příbuzná FeFe hydrogenáze *N. gruberi*, nýbrž spíše *Trichomonas vaginalis* (Barberà *et al.* 2010). Bootstrapová podpora v jednotlivých uzlech však není příliš vysoká.

EST data ukázala, že *Psalteriomonas* a jí příbuzná *Sawyeria* mají mitochondriální derivát, jenž lze označit termínem hydrogenosom (De Graaf *et al.* 2009; Barberà *et al.* 2010, obecná definice hydrogenosomu např. Embley *et al.* 1997, Embley 2006). V EST *S. marylandensis* byly objeveny též mitochondriální dráhy, které v ostatních studovaných hydrogenosomech dosud objeveny nebyly. Lze shrnout, že jde o hydrogenosom s novou kombinací biochemických vlastností.

Heterolobosea se tak stávají skupinou, která může otevřít nové možnosti komparativních studií s cílem porozumět přeměně mitochondrie v hydrogenosom. Aby to ale bylo možné, musíme lépe poznat vnitřní fylogenezi heteroloboseí a biochemické dráhy v mitochondriálních homolozích jejich aerobních a anaerobních zástupců. Nezbytným krokem na této cestě je identifikace anaerobních linií heteroloboseí a určení jejich vzájemných příbuzenských vztahů. Objev mitochondrií bez krist u druhu *Pleurostomum flabellatum* dává naději, že existuje více linií anaerobních heteroloboseí. Otázkou zůstává,

jestli *N. gruberi* představuje spíše plesiomorfni stav biochemie heterolobosních mitochondrií, anebo odvozenou fakultativně anaerobní linii.



Obr. 3: Rozšíření enzymů spojených s anaerobním energetickým metabolismem u eukaryot. Publikované drafty nebo kompletní genomové sekvence byly analyzovány pomocí nástroje BLAST. S výjimkou PFO a acetát:sukcinát CoA transferázy indikují černé čtverce vysokou míru homologie (první hity v recipkové BLAST analýze). Prázdné čtverečky naopak značí absenci genomových dat. Šedivé čtverečky značí biochemický důkaz pro přítomnost uvedeného enzymu. Absence jakéhokoliv symbolu znamená, že z daného organismu je k dispozici draft nebo kompletní genom a gen pro daný enzym v něm nebyl zachycen. V případě PFO znamená černý čtvereček kanonickou podobu PFO, kolečko a trojúhelníček značí dvě určité nekanonické podoby tohoto enzymu. V případě acetát:sukcinát CoA transferázy znamená trojúhelník přítomnost homologu 1A (příbuzný savčí SCOT transferáze), kolečko značí přítomnost homologu 1B, pětiúhelník značí přítomnost homologu 1C. Upraveno podle Ginger *et al.* 2010.

2.5. Fylogeneze a taxonomie skupiny Heterolobosea

2.5.1. Kompletní taxonomie skupiny Heterolobosea na úrovni rodů

Vzhledem k tomu, že taxonomie heteroloboseí na úrovni vyšší než rod není jednotná a neodpovídá poznatkům o fylogenezi kmene, uvádím taxonomii kmene na rodové úrovni. Uvedena je i částečná rodová synonymizace (pouze rody, které byly zcela zrušeny), typové druhy a celkový počet druhů v daných rodech. Celkově obsahují Heterolobosea 32 popsanych platných rodů (viz seznam níže) ve zhruba 140 v současnosti uznávaných druzích (odhad autora). Taxonomie na úrovni vyšší než druh zde není uváděna, protože není jednotná a obsahuje parafyletické skupiny. Příklady členění heteroloboseí na vyšší úrovni viz např. Page & Blanton 1985, Cavalier-Smith 1993b, Cavalier-Smith & Nikolaev 2008. U jednotlivých rodů je uvedena převzatá diagnóza, pokud diagnóza není v literatuře uvedena nebo je jen velmi povrchní, uvádí autor diagnózu vlastní (označena *).

Allovahlkampfia Walochnik & Mulec, 2009

Diagnóza (Walochnik & Mulec 2009): Jednojaderné měňavky s typickou morfologií připomínají ostatní zástupce skupiny Vahlkampfiidae (jak trofozoit, tak cysta). Uroid měňavky je nápadný, uroidální filamenta mohou být velmi dlouhá. Bičíkaté stádium nebylo indukováno. Cysty jsou kulovité a neobsahují žádné póry. Vnější stěna cysty je velmi těsně přitisknuta na endocystu.

Pozn. autora: Determinace tohoto rodu od jiných podobných rodů je v praxi založena na fylogenetické pozici v analýzách sekvencí SSU rDNA a 5.8 rDNA. Morfologicky je totiž, jak vyplývá z diagnózy, nerozlišitelná od jiných zástupců (např. od rodu *Vahlkampfia* a *Neovahlkampfia*).

Typový druh: *A. spelaea* Walochnik & Mulec, 2009 (monotypický rod).

Acrasis Van Tieghem, 1880

Diagnóza (Olive 1970): Organismus, který je v jednobuněčné formě měňavkovitý, ale umí tvořit i mnohobuněčné plodničky. Spóry vytváří na sorokarpu jednoduché či větvené řetězce. Zbarvení sorokarpů růžové nebo tmavě fialové. Bičíkatá stádía neznámá.

Typový druh: *A. granulata* Van Tieghem, 1880 (rod má dnes 3 druhy).

Euplaesiobystra Park, Simpson, Brown & Cho, 2009

Diagnóza (Park et al. 2009): Limax améba s bičíkatým stádiem a se schopností tvorby cyst s vnějším obalem (ektocysta). Bičíkovec se dvěma bičíky a bez nápadného cytostomu. Cysta má zazátkované póry ve vnějším obalu. Jedno jádro s centrálním nukleolem. Obligátne halofilní.

Typový druh: *E. hypersalinica* Park, Simpson, Brown a Cho, 2009 (monotypický rod).

Gruberella Page, 1984

Diagnóza (Page & Blanton 1985): Velká améba obývající mořské prostředí, mnohoaderná. Pohyb pomocí eruptivních panožek, povrch buňky pokryt tenkým glykokalyxem. Nukleolus se rozpadá během mitózy.

Typový druh: *G. flavescens* (Gruber, 1889) (monotypický rod)

Guttulinopsis Olive, 1902

*Diagnóza: Měňavky jednojaderné s centrálním jadérkem. Buňky jsou schopny agregace za vzniku mnohobuněčné plodničky. Barva plodniček je proměnlivá v závislosti na substrátu a stupni vyschnutí (od bílé po špinavě žlutou). Stěna spor je bilaminární, encystované buňky jsou uloženy v kapkách tekutiny a jsou vzájemně oddělené. Stélka plodnic obsahuje fibrilární matrix. Vyskytuje se na trusu různých zvířat.

Typový druh: *G. vulgaris* Olive, 1902 (dnes obsahuje 4 druhy)

Heteramoeba Droop, 1962

Diagnóza (Droop 1962): Limax améba schopná tvorby bičíkovců se dvěma bičíky a hlubokým cytostomem, který je obklopen límcem. Cysty bez viditelných pórů. Jednojaderný organismus, jadérko je rozpadlé do nepravidelných shluků u jaderné membrány.

Typový druh: *H. clara* Droop, 1962 (monotypický rod)

Lyromonas Cavalier-Smith, 1993

*Diagnóza: Jednojaderní sladkovodní bičíkovci bez stadia měňavky. Matigont se čtyřmi bičíky zhruba stejné délky. Mitochondriální deriváty nemají krysty. V buňce je přítomna globule obsahující mitochondriální deriváty a methanogenní bakterie.

Typový druh: *L. vulgaris* (Broers, Meyers Seymens, Brugerolle, Stumm & Vogels, 1993)
(monotypický rod)

Marinamoeba De Jonckheere, Baumgartner, Opperdoes & Stetter, 2009

Diagnóza (De Jonckheere *et al.* 2009): Mořská améba pohybující se pomocí eruptivních panožek. Uroid je vytvářen. Jedno jádro s jediným jadérkem, schopnost produkce cyst. Neroste ve vysokých salinitách, bičíkaté stádium neznámé.

Typový druh: *M. thermophila* De Jonckheere, Baumgartner, Opperdoes & Stetter, 2009
(monotypický rod)

Monopylocystis O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003

Diagnóza (O'Kelly *et al.* 2003): Jednojaderné měňavky. Lezoucí forma se pohybuje pomocí typických polokulovitých panožek. Jádro v obrysu více nebo méně hranaté. Jadérko není centrální, má podobu tenkého prstence blízko jaderné membrány. Golgiho aparát a mitochondriální kristy chybí. Cysty mají jeden pór, který je uzavřen želatinózní zátkou.

Typový druh: *M. visvesvarai* O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003
(monotypický rod)

Naegleria Alexeieff, 1912

Diagnóza (De Jonckheere 2002): V životním cyklu přítomno stádium bičíkovce, měňavky a cysty. Měňavka s eruptivními lobopodiemi. Cysty mají zazátkované póry, pomocí nichž se améba encystuje. U většiny druhů je přítomno stádium bičíkovce, které je ale pouze přechodné. U některých druhů může být toto stádium obtížně indukovatelné, popřípadě může zcela chybět. Postrádá cytostom a je obvykle dvoubičíkaté a neschopné dělení. Přinejmenším u některých izolátů jsou bičíkovci v první fázi čtyřbičíkatí a schopni se jedenkrát rozdělit (na dvě dvoubičíkaté buňky).

Typový druh: *N. gruberi* (Schardinger, 1899) (dnes je do tohoto rodu řazeno okolo 50 druhů).

Neovahlkampfia Brown & De Jonckheere, 1999

*Diagnóza: Limax améba. Morfologicky nerozlišitelná od rodu *Vahlkampfia*. Determinace založena na fylogenetické pozici v analýzách SSU rDNA a ITS regionu. Formální diagnóza chybí.

Typový druh: *N. damariscottae* (Page, 1974) (monotypický rod)

Oramoeba De Jonckheere, Baumgartner, Eberhardt, Opperdoes & Stetter 2011

Diagnóza (De Jonckheere 2011): Mořští améboflageláti s eruptivními panožkami. Mají jedno jádro s jedním jadérkem, které není dobře vyrýsované. Uroid s vlečnými filamenty. Bičíkaté stádium může nést až 10 bičíků, zřejmě se může dělit. Cysty nemají žádné póry.

Typový druh: *O. fumarolia* De Jonckheere, Baumgartner, Eberhardt, Opperdoes & Stetter 2011 (monotypický rod)

Paravahlkampfia Brown & De Jonckheere, 1999

*Diagnóza: Limax améba, bičíkaté stádium není známo. Cysta na povrchu hladká, bez pórů. Na zadním konci buňky jsou přítomna uroidální filamenta a *collopodium* (shluk adhezivních filament).

Pozn. autora: Formálně nebyla diagnóza tohoto rodu vyslovena. Brown & De Jonckheere (1999) vytvořili tento rod jen na základě fylogenetické pozice v analýze genu SSU rDNA. Brown a De Jonckheere (2004) však uvádí i morfologické charakteristiky, na základě kterých lze diagnózu vytvořit.

Typový druh: *P. ustiana* (Page, 1974) (dnes rod obsahuje 3 druhy)

Percolomonas Fenchel a Patterson, 1986

Diagnóza (Larsen a Paterson 1990): Bičíkovec se čtyřmi bičíky, nejdelší používá k adhezi k substrátu, ostatní k přihánění potravy.

Typový druh: *P. cosmopolitus* (Ruinen, 1938) (rod dnes obsahuje 7 druhů)

Pernina Kadiri, Joyon & Pussard, 1992

Diagnóza (Patterson et al. 2000a): Mořská améba tvořící eruptivní lobopodie (monopodiální). Obvykle jednojaderná, centrální jadérko. Mitochondrie s plochými kristami, povrch buňky nahý, bez glykokalyxu. Cysty s dvojitou stěnou. Uroidání filamenta jsou běžně vytvářena.

Typový druh: *P. chaumonti* Kadiri, Joyon & Pussard, 1992 (monotypický rod)

Pharyngomonas Cavalier-Smith & Nikolaev, 2008

Diagnóza (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008): Bičíkovec se čtyřmi bičíky umístěnými na vrcholu buňky, dva bičíky jsou namířeny dopředu, dva zpět. Jádro je přiložené k zadnímu konci

kinetidy a má jedno velké, centrální jádérko. Dvojice zpětně namířených bičíků je spojena s dlouhou ventrální rýhou procházející od konce jádra na protilehlý konec buňky. Měňavkovité stádium chybí. Obývá hypersalinní prostředí.

Typový druh: *P. kirbyi* Cavalier-Smith & Nikolaev, 2008 (2 popsané druhy)

Pleurostomum Namyslowski, 1913

Diagnóza (Park et al. 2007): Buňky se dvěma paralelními bičíky, které vychází blízko předního konce buňky a bijí homodynamicky. Cytostom se otevírá laterálně, ovšem posteriorně od místa, z něhož vychází bičíky. Výskyt omezen na hypersalinní prostředí.

Typový druh: *P. salinum* (Namyslowski, 1913) (rod dnes obsahuje šest druhů)

Pocheina Loeblich & Tappan, 1961

Diagnóza (Olive et al. 1983): Organismus, který v jednobuněčné formě vytváří měňavky nebo bičíkovce, ale umí tvořit i mnohobuněčné plodničky. Sorokarpy a buňky růžově oranžové. Sorus kulovitý. Spóry jemně tečkované, síťkované. Jak spóry, tak buňky stélky jsou plodné, produkující améby nebo améby a bičíkovce. Roste na dřevě či kůře.

Typový druh: *P. rosea* Cienkowski 1884 (2 druhy)

Psalteriomonas Broers, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1990

Diagnóza (Broers et al. 1990): Volně žijící améboflagelát, sladkovodní, obývajících prostředí s nízkou koncentrací kyslíku. Stádium cysty neznámé. Klasický Golgi chybí, mitochondrie bez krist. Měňavkové stádium jednojaderné, klasická limax améba. Bičíkaté stádium se čtyřmi bičíky podobné délky v jedné kinetidě. Bičíky vycházejí z vrcholu buňky. Složitý mikrotubulární lem (R1) je připojen na bazální tělíska a vychází z něj dvě mikrotubulární fibrily podporující okraje potravní rýhy. Svazek mikrofilament (MB) je připojen k R1r.

Typový druh: *P. lanterna* Broers, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1990 (dnes monotypický rod)

Pseudovahlkampfia Sawyer, 1980

Diagnóza (Sawyer 1980): Malá jednojaderná limax améba s eruptivními panožkami. Může vytvářet mnohojaderná obří stádía schopná se plasmotomií rozdělit na malé měňavky. Vytváří pseudocysty, stádium cysty neznámé. Baňatý uroid s vlečnými filamenty.

Typový druh: *P. emersoni* Sawyer, 1980 (monotypický rod).

Rosculus Hawes, 1963

Diagnóza (Hawes 1963): Malé améby s dobře vyvinutými hyalinními panožkami. Jádru s velmi dobře viditelným jadérkem (šířka jadérka není větší než půl průměru jádra). Chromatin okrajový, v granulích na jaderné membráně. Cysty oválné, jednojaderné.

Typový druh: *R. ithacus* Hawes, 1963 (monotypický rod)

Sawyeria O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003

Diagnóza (O'Kelly et al. 2003): Jednojaderné měňavky. Lezoucí forma se pohybuje pomocí typických polokulovitých panožek. Jádru s jedním nebo dvěma parietálními jadérky. Jadérka jsou často umístěna na opačných pólech buňky a mají podobnou velikost. Klasický Golgi a mitochondriální kristy chybí.

Typový druh: *S. marylandensis* O'Kelly, Silberman, Amaral Zettler, Nerad & Sogin, 2003 (monotypický rod)

Solumitrus Anderson, Wang, Faucher, Bi, Shuman, 2011

Diagnóza (Anderson et al. 2011): Malé ztlustlé améby s eruptivními panožkami. Jádru s centrálním jadérkem. Jádru během pohybu améby typicky umístěné ve středu buňky. Uroid malý, kulovitý, může mít několik málo adhezivních uroidálních filament, někdy s jemnými postranními větvemi. Cysty tlustostěnné, bez pórů. Mitochondrie obalené drsným endoplasmatickým retikulem.

Typový druh: *S. palustris* Anderson, Wang, Faucher, Bi, Shuman, 2011 (monotypický rod).

Stachyamoeba Page, 1975

Diagnosis (Page 1988): Jednojaderná améba bez známého stádia bičíkovce. Cysta hladká, bez pórů. Pohyblivá forma obvykle zploštělá, nepravidelného tvaru. Někdy lžícovitého nebo flabelárního tvaru. Vytváří jemná subpseudopodia. Někdy válcovitá (limax) a bez subpseudopodií. Jadérko se během mitózy rozpadá.

Typový druh: *S. lipophora* Page, 1975 (monotypický rod).

***Stephanopogon* Entz, 1884**

Diagnóza (Patterson et al. 2000b): Mořský bičíkovec s mnoha bičíky vycházejícími z buňky v řadách. Buňka dorzoventrálně zploštělá. Na předním konci je vytvořen cytostom se ztlustlými okraji. Vícejaderný, schopen tvořit cysty.

Typový druh: *S. colpoda* Entz, 1884 (dnes 6 druhů)

***Tetramastigamoeba* Singh & Hanumaiah, 1977**

Diagnóza (Page 1988): Bičíkaté stádium má 4 bičíky a žádný cytostom. Bičíkovec je schopen se opakovaně dělit za vzniku menších buněk. Ty se mohou transformovat do měňavkovitého stádia. Cysta neobsahuje žádné póry.

Typový druh: *T. hoarei* Singh & Hanumaiah, 1977 (monotypický rod)

***Trimastigamoeba* Whitmore, 1911**

Diagnóza (Page 1988): Améboflagelát, jehož cysta má i vnější obal (ektocysta). Bičíkaté stádium v klasickém zralém stavu nese 4 bičíky. Bičíky vycházejí ze dna trubicovité vchlípeniny na přední části buňky. Měňavkovité stádium má eruptivní panožky.

Pozn. autora: Podle originálního popisu (Whitmore 1911) se bičíkaté stádium nedělí a má většinou 3 bičíky. Podle pozdější diagnózy založené na jiném izolátu (Bovee 1959) se dělí jak stádium améby, tak bičíkovce. Stádium bičíkovce má sice v určité krátké fázi vzniku 3 bičíky, ale po dozrání 4 bičíky.

Typový druh: *T. philippenensis* Whitmore, 1911 (monotypický rod)

***Tetramitus* Perty 1852**

Synonyma: *Adelphamoeba*, *Didascalus*, *Learamoeba*, *Paratetramitus* a *Singhamoeba*

*Diagnóza: Jednoznačná morfologická diagnóza dnes chybí, morfologicky velmi různorodý taxon. Příslušníky tohoto rodu jsou měňavky i améboflageláti. Bičíkaté stádium u některých druhů převážně dvoubičíkaté u jiných čtyřbichíkaté. Viditelný cytostom je u bičíkovců některých druhů vytvořen, u jiných chybí. Může být přítomno rostrum. Cysty nesou jeden či více pórů nebo póry mohou úplně chybět.

Pozn. autora: Dle De Jonckheere et al. (2005) je možné rozlišit tento rod od ostatních pomocí sekvence ITS regionu.

Typový druh: *T. rostratus* Perty, 1852 (dnes do tohoto rodu řazeno okolo 15 druhů)

Tulamoeba Park, Simpson, Brown & Cho, 2009

Diagnóza (Park et al. 2009): Limax améba bez známého bičíkatého stádia. Cysty s jednoduchou buněčnou stěnou (bez ektocysty) a s jediným zazátkovaným pórem. Jediné jádro a centrální nukleolus. Obligátně halofilní.

Typový druh: *T. peronaphora* Park, Simpson, Brown & Cho, 2009 (monotypický rod)

Vahlkampfia Chatton & Lallung Bonnaire 1912

*Diagnóza: Jednoznačnou morfologickou diagnózu není možné v současné době stanovit. Definován negativně - absence bičíkatého stádia a pórů v cystách. V praxi je tento rod determinován fylogenetickou pozicí založenou na 5.8S rDNA a SSU rDNA.

Pozn. autora: Brown a De Jonckheere (1999) jako nový typový druh v rozporu s předpisy ICZN určil druh *Vahlkampfia avara* Page 1967. Brown & De Jonckheere (1999) do tohoto rodu neřadí druhy, jež nebyly molekulárně-fylogeneticky studovány, ačkoliv to nijak nekomentují. Nejasné je proto zařazení *Vahlkampfia vahlkampfi* Chatton, 1910 či *Vahlkampfia anaerobica* Smirnov & Fenchel, 1996. Morfologickou diagnózu neuvádí, proto je počet druhů nejasný.

Typový druh: *V. vahlkampfi* (Chatton, 1910) (počet druhů je zcela nejasný)

Vrihiamoeba Murase, Kawasaki & De Jonckheere, 2010

Diagnóza (Murase et al. 2010): Půdní améba pohybující se eruptivními panožkami, které mohou mít příležitostně lžícovitý nebo flabelátní tvar. Bičíkaté stádium neznáme, ale cysty byly pozorovány.

Typový druh: *V. italica* Murase, Kawasaki, De Jonckheere, 2010 (monotypický rod).

Willaertia De Jonckheere, Dive, Pussard & Vickermann, 1984

Synonymum: *Protonaegleria*

Diagnóza (Robinson et al. 1989): Trofozoiti měňavkovití, s eruptivními panožkami, jedno- nebo mnohoaderní. Přechodné bičíkaté stádium vytvořeno. Cytostom chybí, obvykle nese 4 bičíky. Počet bičíků v dceřiných buňkách po dělení je variabilní. Bičíkovec je schopen více

po sobě jdoucích dělení. Cysta je obalena ještě vnějším obalem (ektocysta) a obsahuje póry s mukoidní zátkou.

Typový druh: *W. magna* De Jonckheere, Dive, Pussard & Vickermann, 1984 (dnes monotypický rod)

2.5.2. Fylogeneze skupiny Heterolobosea

Fylogenetické analýzy vnitřního členění heteroloboseí jsou zatím založeny pouze na genu pro SSU rRNA (např. Nikolaev *et al.* 2004; Cavalier-Smith & Nikolaev 2008; Park *et al.* 2009; Brown *et al.* 2010). Sekvence tohoto genu ale z některých klíčových rodů dosud chybí (např. *Rosculus*, *Lyromonas*, *Guttulinopsis*, *Pocheina*, *Pseudovahlkampfia*, *Pernina*, *Gruberella*). Naopak pozice některých rodů, jejichž sekvence SSU rDNA již byla analyzována, zůstává na fylogenetických stromech nestabilní a při porovnání morfologických znaků je často dosti nečekaná (např. Yubuki & Leander 2008a). Multigenové analýzy jsou doposud poměrně málo informativní, neboť vzorkování dalších genů (pomineme-li 5.8rDNA a ITS užívané při vnitrorodových analýzách) je u heteroloboseí velice nedostačující a umožňuje do vícegenové fylogenetické analýzy zahrnout jen rody *Naegleria*, *Sawyeria*, *Percolomonas*, *Stephanopogon*, *Acrasis*, *Stachyamoeba* sp. (izolát ATCC 50324) a popřípadě *Psalteriomonas* (EST data z *Psalteriomonas* ovšem nejsou zveřejněna).

Jak je zmíněno výše, celý problém ještě umocňuje fakt, že řada druhů i rodů kmene Heterolobosea netvoří bičíkatá stádia a neobsahuje ani žádné výrazné cytoskeletální struktury. Nesou tedy jen velmi omezený soubor morfologických a ultrastrukturních znaků využitelných pro rekonstrukci evoluce této skupiny (týká se to např. rodů *Vahlkampfia*, *Sawyeria*, *Monopylocystis*, *Rosculus*, *Neovahlkampfia*, *Paravahlkampfia*, *Acrasis* či *Gruberella*). Rekonstrukce fylogeneze celého kmene na základě porovnání buněčné struktury je proto také značně obtížná. Navíc stále u mnoha klíčových taxonů heteroloboseí s bičíkatými stádii ultrastrukturní data chybí (za všechny např. *Pharyngomonas*, *Stachyamoeba* sp. ATCC 50324 či *Pocheina flagellata*) nebo je nedoplňují sekvenční data (např. *Percolomonas sulcatus*, *Lyromonas vulgaris*).

Analýzy SSU rDNA vykazují ale v některých případech poměrně vysokou míru stability, některé příbuzenské vztahy uvnitř kmene Heterolobosea proto můžeme považovat za rozřešené.

Výčet spolehlivě rozlišených monofyletických linií heteroloboseí:

1. *Percolomonas cosmopolitus* a *Stephanopogon* spp.
2. *Tetramitus* spp. a *Vahlkampfia* spp.
3. *Naegleria* spp., *Willaertia magna*, *Tulamoeba peronaphora*, *Pleurostomum flabellatum* a *Marinamoeba thermophila*
4. *Acrasis* spp., *Allovahlkampfia spelaea*, *Solumitrus palustris*, environmentální sekvence AND12 (v GenBank pod číslem AY965862), BA (v GenBank pod číslem DQ388519), OSA (v GenBank pod číslem DQ388520)
5. *Neovahlkampfia damariscottae* a environmentální sekvence LC10 (v GenBank pod číslem DQ504339) a AND9 (v GenBank pod číslem AY965861)
6. *Paravahlkampfia* spp. a environmentální sekvence RT5in38 (v GenBank pod číslem AY082995)
7. *Heteramoeba clara* a *Euplaesiobystra hypersalinica*
8. *Sawyeria marylandensis*, *Monopylocystis visvesvarai*, *Psalteriomonas lanterna* a environmentální sekvence 'Pseudomastigamoeba longifilum' (z GenBank odstraněna na žádost autorů)
9. *Stachyamoeba* sp. ATCC 50324, *Vrihiamoeba italica*, *Oramoeba fumarolia* a environmentální sekvence WIM43 (v GenBank pod číslem AM114803)
10. *Pharyngomonas* sp. ATCC 50622 ('Macropharyngomonas halophila')

Sestaveno na základě výsledků Brown a De Jonckheere 2004; Nikolaev *et al.* 2004; Garstecki *et al.* 2005; Cavalier-Smith & Nikolaev 2008; De Jonckheere *et al.* 2009; Park *et al.* 2009; Visvesvara *et al.* 2009; Walochnik & Mulec 2009; Brown *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2011; De Jonckheere *et al.* 2011.

2.5.3. Region 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí

Vnitřní fylogenezi heteroloboseí nedokáží fylogenetické analýzy založené na genu pro SSU rRNA spolehlivě rozlišit. Naopak samotnou příslušnost k této skupině lze na základě genu pro SSU rRNA velmi dobře odhalit, a to ze dvou důvodů: (1) Heterolobosea mají ve fylogenetických analýzách založených na tomto genu vysokou podporu (při použití metody maximum likelihood bootstrapová podpora přes 90); (2) díky přítomnosti unikátní oblasti označované jako 17-1 helix, v sekundární struktuře SSU rRNA.

Obecně platí, že sekvence oblastí SSU rRNA, které nemají funkční význam, se mohou rychle měnit. Naopak oblasti, které mají funkční význam, jsou mnohem konzervativnější (Wuyts *et al.* 2001). V SSU rRNA bylo nalezeno také několik oblastí, které jsou unikátní pro určitou eukaryotickou linii (nebo pro několik málo linií). Jedním z takových příkladů je **17-1 region**, který se vyskytuje pouze u heteroloboseí (Wuyts *et al.* 2001) a jim zcela nepříbuzného prvoka druhu *Pelomyxa palustris* (Milyutina *et al.* 2001). To z regionu 17-1 činí téměř ideální prostředek, jak ze sekvence SSU rDNA zjistit, že daný organismus patří mezi Heterolobosea. Přesto byla doposud publikována predikce sekundární struktury SSU rRNA v 17-1 regionu jen u několika málo druhů heteroloboseí (např. Nikolaev *et al.* 2004; Park *et al.* 2007). Jedinou známou výjimkou heteroloboseí, u kterého chybí 17-1 region je rod *Pharyngomonas*, který má ovšem v rámci heteroloboseí bazální postavení (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Izolace a kultivace prvků

3.1.1. Složení a příprava používaných médií

Sonnenbornovo médium (ATCC 802) – modifikováno

Použité chemikálie: *Cereal Grass Media (Scholar Chemistry, USA); Na₂HPO₄; destilovaná voda*

Příprava: Do 1000 ml destilované vody přidat 2,5 g Cereal Grass Media (vysušené obilné listy) a přivést k varu. Po 5 minutách varu suspenzi přefiltrovat přes filtrační papír a doplnit do 1000 ml destilovanou vodou. Nakonec přidat 0,5 g Na₂HPO₄ a sterilizovat v autoklávu (15 – 20 minut při 121 °C). Před použitím nechat alespoň 12 hodin odstát a sterilně rozplnit po 9 ml do 15ml polypropylenových kónických zkumavek. Médium uchovávat při 4 °C. Na rozdíl od klasického Sonnenbornova média se v tomto případě používalo nebakterizované.

Luria-Bertani (LB) médium

Použité chemikálie: *LB broth (Sigma-Aldrich, USA); bakteriologický agar (Oxoid Limited, UK); destilovaná voda.*

Příprava: 10 g LB broth rozpustit v 0,5 l destilované vody a sterilizovat v autoklávu (15 – 20 min při 121 °C). Nepoužité médium uchovávat při 4 °C.

Pro pěstování bakterií *Escherichia coli* na Petriho miskách bylo před sterilizací do LB média přidáno ještě 6 g bakteriologického agaru.

3% Luria-Bertani médium (3% LB)

Použité chemikálie: *LB broth (Sigma-Aldrich, USA); destilovaná voda.*

Příprava: 0,3 g LB broth rozpustit v 500 ml destilované vody a sterilizovat v autoklávu (15 – 20 min při 121°C). Před použitím sterilně rozplnit po 10 ml do 15ml polypropylenových, kónických zkumavek. Nepoužité médium uchovávat při 4 °C.

Umělá mořská voda (ASW)

Použité chemikálie: *CaCl₂·2H₂O; KCl; MgCl₂·6H₂O; MgSO₄·7H₂O; NaCl; NaHCO₃; destilovaná voda.*

Umělá mořská voda byla připravována jako 0,009M roztok KCl, 0,423M roztok NaCl, 0,0093M roztok CaCl₂, 0,023M roztok MgCl₂, 0,0255M roztok MgSO₄ a 0,002M roztok NaHCO₃.

Nejdříve se ASW připravovala v jednom roztoku a sterilizovala se filtrováním přes sterilizační filtr s oky velikosti 0,2 µm. Vzhledem k vysoké spotřebě ASW při přípravě ATCC 1525 média a 3% SWLB média a časové náročnosti tohoto procesu byl později zvolen alternativní postup přípravy. Aby se

zamezilo vysrážení přidávaných solí a přitom se obešlo filtrování, byla ASW připravována ve třech oddělených roztocích, které se smíchaly až po sterilizaci v autoklávu (15 – 20 minut při 121 °C) a po zchladnutí na pokojovou teplotu. V jednom roztoku byly rozpuštěné pouze chloridy (0,68 g KCl, 4,66 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24,72 g NaCl a 1,36 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), v druhém roztoku bylo rozpuštěno 6,29 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a ve třetím pak 0,18 g NaHCO_3 .

Mořské 802 médium (ATCC 1525)

Použité chemikálie: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; *Cereal Grass Media (Scholar Chemistry, USA)*; destilovaná voda; KCl; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; NaCl; NaHCO_3 .

Příprava: Přípravuje se sterilním smícháním 2x koncentrovaného ATCC 802 média (bez přidaného Na_2HPO_4) a 2x koncentrované umělé mořské vody v poměru 1:1. Před použitím sterilně rozplnit po 10 ml do 15ml polypropylenových, kónických zkumavek. Nepoužité médium uchovávat při 4 °C.

Mořské 3% Luria-Bertani médium (3% SWLB)²

Použité chemikálie: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; KCl; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; *LB broth (Sigma-Aldrich, USA)*; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; NaCl; NaHCO_3 ; destilovaná voda.

Příprava: 3% SWLB se připravuje přidáním 0,3 g LB broth do ASW.

3.1.2. Metody sběru vzorků

Vzorky mikrobioty byly odebírány v organicky bohatých mikrooxických a anoxických sladkovodních i mořských sedimentech, a to do 15ml nebo 50ml polypropylenových zkumavek tak, aby v nich zbylo jen minimum vzduchu. Odebraná voda a sediment byly ve zkumavce obvykle v poměru 1:1. V některých případech byl poměr posunut ve prospěch sedimentu. Pokud to dovoľoval způsob přepravy do laboratoře, byly takto odebrané vzorky uchovávány v pokojové teplotě a většinou během 14 dnů od sběru kultivovány v příslušných médiích.

3.1.3. Metody kultivace

Zhruba 1 ml odebraného materiálu byl inokulován do 9 ml ATCC 802 (sladkovodní vzorky) nebo 10 ml ATCC 1525 média (mořské vzorky). Brakické vzorky byly kultivovány ve směsi ATCC 1525 a ATCC 802

² Kolisko *et al.* 2010 pro toto médium používají zkratku 3% LB, která je zde použita pro sladkovodní variantu tohoto média (viz výše).

média v poměru 1:1 nebo 3% SWLB a ATCC 802 v poměru 1:1. Některé sladkovodní kultury byly úspěšně převedeny do 3% LB média, některé mořské kultury do 3% SWLB nebo do směsi 3% SWLB a ATCC 1525 média v poměru 5:5 či 9:1. V případě primokultury bylo pasážování provedeno obvykle po 14ti dnech od inokulace vzorku. Pasážování kultur se pak opakovalo každých 7 dní (inokulum cca 0,2 – 1 ml dle izolátu).

Každá kultura byla udržována alespoň po dobu pěti pasáží. Pokud po celou tuto dobu nebyla kultura pozitivní na žádný potenciálně zajímavý druh protist, nepokračovalo se dál v jejím pasážování.

Kultivace probíhala v temnu a v pokojové teplotě (cca 23 °C). V některých případech byla kultura obohacena o anaerobní a mikroaerofilní protista díky generování anaerobní, popřípadě mikroaerofilní atmosféry (pasážování pak bylo možné opakovat až ve 14ti denních cyklech). Pro generování anaerobní atmosféry bylo použito přípravku AnaeroGen (Oxoid Limited, VB) vloženého do 2,5 litrové nádoby AnaeroJar 2.5 l (Oxoid Limited, VB); pro vytvoření mikrooxické atmosféry se do této nádoby vkládal přípravek CampyGen (Oxoid Limited, VB).

3.1.4. Kryoprezervace kultur prvoků

Použité chemikálie: *DMSO (dimethylsulfoxid), isopropanol, tekutý dusík*

Některé významné kultury heteroloboseí byly pokusně zmrazeny v tekutém dusíku. Jako kryoprotektor byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), viabilita byla ověřena vždy rozmrazením jednoho kontrolního vzorku. DMSO byl jako kryoprotektor při kryoprezervaci kultur heteroloboseí s úspěchem použit i jinými autory (Alexander *et al.* 1980; Brown & Day 1993).

Postup zmrazování: Napěstovat kulturu ve čtyřech 15ml zkumavkách, z každé odebrat 1 ml ze dna. Přidat sterilní DMSO do finální koncentrace 5% roztoku. Invertováním zkumavky opatrně promíchat její obsah a rozplnit po 1 ml do připravených ampulí *CryoTube™ Vials* (Thermo Fisher scientific-NUNC). Vložit do *Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo 1 °C Freezing container* s 250 ml isopropanolu. Nechat postupně ochlazovat až na konečnou teplotu -70 °C v hlubokomrazícím boxu. Druhý den ampule uložit do kryobanky s tekutým dusíkem.

Postup rozmrazování: Ampuly vyjmout z tekutého dusíku, 2 – 5 sekund nechat na vzduchu (vypaří se dusík, který případně natekl do vzorku) a poté vhodit do vodní lázně ohřáté na 37 – 45 °C. Po rozpuštění obsahu ampule ihned celý objem inokulovat do 15ml zkumavky s 9 ml příslušného kultivačního média a promíchat. Nakonec z takto vytvořené kultury inokulovat 1 ml do další 15ml zkumavky s kultivačním médiem. Obě kultury pasážovat paralelně alespoň 5 cyklů (platí pro kontrolu úspěchu kryoprezervace).

3.2. Světelná mikroskopie

3.2.1. Nativní preparáty

Heterolobosea byla pozorována v kapce média (přikryté krycím sklíčkem) na podložním skle s použitím mikroskopů vybavených fázovým kontrastem (mikroskop Zeiss, Německo) či Nomarského diferenčního interferenčního kontrastem (Olympus BX 51TF, Japonsko). V některých případech byla pro stabilizaci pohybujících se buněk v nativních preparátech použita krycí sklíčka natřená poly-lysinem, popřípadě se do vzorku přidalo malé množství formaldehydu (narkotizace). V případě pozorování améboidních heteroloboseí byla použita také podložní skla s jamkou.

3.2.2. Barvení podle Giemsa-Romanowski

Použité chemikálie: *Giemsa stain (Sigma-Aldrich, USA), methanol, destilovaná voda*

Postup: Na odmaštěná podložní sklíčka odpipetovat kapku buněčné suspenze z dobře narostlé kultury. Provést suchý roztěr a po zaschnutí fixovat methanolem cca 5 minut. Poté preparáty osušit a nechat barvit ve skupinách po 30, 40 a 50 minutách roztokem Giemsy naředěným destilovanou vodou v poměru 1:20. Pak preparáty opláchnout ve slabém proudu tekoucí vody, osušit a pozorovat. Takto připravené preparáty je v případě dlouhodobého uchovávání nutné skladovat v temnu a suchu.

3.2.3. Barvení protargolem podle Bodiana modifikováno podle Nie (1950) a Ptáčková 2010

Použité chemikálie: *0,25% roztok AuCl_3 ; kovová měď ve formě drátků; octan měďnatý; 0,5% roztok KMnO_4 ; Na_2SO_3 ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; kyselina pikrová; 5% a 2% roztok kyseliny šťavelové; 100% (ledová) kyselina octová; 40% roztok formaldehydu, ethanol, xylol, 1% roztok protargolu (Bayer); odvodňovací a zalévací řada (50% ethanol, 70% ethanol, 80% ethanol, 96% ethanol, 100% ethanol, karbolxylol, xylol); redukční roztok (roztok 1% hydrochinonu a 5% Na_2SO_3); DPX Mountant for Histology (Sigma Aldrich, USA); destilovaná voda.*

Postup:

Při barvení protargolem se fixuje za vlhka. Díky tomu zůstane zachována prostorová struktura buněk a je možno pozorovat vzájemné uspořádání organel. Protargolem se obarví jádro, cytoplasma, bičíky a další cytoskeletární struktury. Vzhledem k tomu, že použití této náročné metody nepřinese vždy uspokojivý výsledek, je nutné každý vzorek barvit na více sklíčkách současně (alespoň na dvou, ideálně ovšem na pěti). Po celou dobu barvení je nutno dbát, aby preparát nevyschl.

Příprava před fixací:

1. Připravit Bouin-Hollandovu fixáž. V destilované vodě rozpustit 25 g octanu měďnatého, ve vzniklém roztoku pak rozpustit 40 g kyseliny pikrové. Přidat 100 ml 40% roztoku formaldehydu a doplnit destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Fixáž lze uchovávat v temnu při pokojové teplotě.
2. Připravit Petriho misky pro fixaci (1,5 ml ledové kyseliny octové smíchat se 30 ml Bouin-Hollandovy fixáže).
3. Připravit si 1 – 2 cm dlouhé tyčinky z polyethylenu, na jednom konci je žiletkou naříznout do poloviny délky podélným řezem. Na druhém konci označit vrypem číslo a budoucí orientaci preparátu.
4. Připravit roztok sterilně odebraného vaječného bílku (1 díl bílku na 4 díly média).
5. Odebrat část (cca 0,5 – 0,75 ml) kultury do 1,5ml mikrozkušavky a centrifugovat 10 minut na 500 G. Poté odebrat supernatant tím způsobem, že ve zkumavkách zůstane pouze centrifugovaná suspenze buněk (buněčný pelet), která bude zdrojem materiálu pro fixaci.

Postup fixace:

Na odmaštěné krycí sklíčko nanést 1 μ l roztoku bílku a 1 μ l suspenze buněk. Obě kapky smíchat a lehce rozetřít. Ihned vhodit krycí sklíčko do Petriho misky s fixáží nátěrem dolů tak, aby plavalo na hladině. Po několika minutách sklíčko obrátit nátěrem směrem vzhůru a ponořit jej na dno Petriho misky. Fixovat 20 minut – 14 hodin.

Po uplynutí doby fixace preparáty namontovat na připravené polyethylenové tyčinky, opláchnout v 50% ethanolu a třikrát vyprat v 70% ethanolu. V 70% ethanolu mohou být preparáty uchovány i delší dobu.

Postup prvního dne barvení:

1. Preparáty převést ze 70% ethanolu přes 50% ethanol do destilované vody.
2. Preparáty vložit do 0,5% roztoku KMnO_4 a nechat zde 5 minut.
3. Opláchnout v destilované vodě pětkrát (po 30 sekundách).
4. Vložit do 5% roztoku kyseliny šťavelové na 5 minut.
5. Opláchnout v destilované vodě pětkrát (po 30 sekundách).
6. Preparáty vložit do 1% roztoku protargolu a nechat inkubovat 2 dny při 37 °C.

Roztok protargolu se připravuje vždy přímo před použitím. Navážený protargol se nasype na hladinu destilované vody v kádince, kde se nechá samovolně rozpustit. Na dno jiné prázdné kádinky se položí stočený měděný drát (přibližně 5 g na 100 ml protargolu), na něj se nalije roztok protargolu a poté se

do této kádinky narovnájí preparáty tak, aby sklíčka byla ve vertikální poloze. Nakonec se preparáty proloží jemnými měděnými drátky, kádinka se dobře uzavře a umístí do termostatu.

Postup druhého dne barvení:

1. Preparáty opláchnout v destilované vodě dvakrát po 5 sekundách.
2. Vložit na 10 minut do redukčního roztoku (vodný r. 1% hydrochinonu a 5% Na_2SO_3).³
3. Opláchnout v destilované vodě pětkrát po 5 sekundách.
4. Na 5 minut vložit do 0,5 – 1% roztoku AuCl_3 .

(v bodě 4 a 5 se používá plastová pinzeta, aby nedošlo k vysrážení koloidního zlata)

5. Opláchnout v destilované vodě dvakrát po 5s.
6. Preparáty vložit do 2% roztoku kyseliny šťavelové na 5 minut.
7. Opláchnout v destilované vodě pětkrát po 30 sekundách.
8. Vložit do 5% roztoku thiosiřičitanu sodného (ustalovač) na 10 minut.
9. Vypírat pomalu tekoucí vodovodní vodou po dobu 15 – 20 minut.
10. Převést alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%) a xylen I, II a III.
11. Montovat na podložní sklíčka do kapky *DPX Mountant for Histology*.
12. Nechat utuhnout ve vodorovné poloze alespoň 48 hodin.

3.2.4. Pozorování, fotodokumentace a měření buněk v preparátech

K pozorování a fotodokumentaci nativních a barvených preparátů určených pro pozorování ve světelném mikroskopu byly využívány dva mikroskopy Olympus BX51TF vybavené Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem a digitálním fotoaparátem Olympus DP71 či Olympus DP70 (Olympus, Japonsko). Barvené preparáty byly pozorovány v procházejícím světle se zapnutým modrým filtrem, ale bez Nomarského DIC. Ke komunikaci s fotoaparátem byl použit program Quick PHOTO CAMERA 2.3 (v případě DP71) nebo Quick PHOTO MICRO 2.2 (v případě Olympus DP70). V některých případech byly skládány fotografie různých rovin barvených preparátů pomocí programu Helicon Focus 4.48. Získané fotografie byly upraveny pomocí softwaru CorelDraw Graphics Suite X3.

Délka a šířka buněk z vybraných izolátů byla měřena pomocí softwaru Quick PHOTO CAMERA 2.3 a Quick PHOTO MICRO 2.2. Byly měřeny jak živé buňky, tak buňky barvené protargolem. Zaživa byla měřena alespoň dvojice izolátů představujících jeden předpokládaný druh. Výjimkou je jen *Monopylocystitis visvesvarai* PC4BIC a PC4AM, u nichž byl k dispozici pouze jediný izolát. Měňavky byly měřeny v lokomotivních formách. V případě měření zaživa bylo vždy vyšetřováno více pasází

³ Redukční roztok funguje jako vývojka.

dané kultury a preparáty byly po několika minutách vyměňovány, neboť v důsledku vyšší koncentrace kyslíku docházelo během několika minut k deformaci sledovaných buněk. V případě organismu PC4AM byly měřeny i různé životní formy, jejich četnost v kultuře se však výrazně liší, proto nebylo možno z časových důvodů získat stejný počet měření. V ostatních případech bylo zaživa měřeno vždy 50 jedinců. V případě protargolového barvení to bylo 20 – 30 jedinců (s výjimkou mnohobičíkaté formy PC4AM, kde to bylo jen 10 jedinců).

Šířka buněk byla měřena v nejširším místě, délka byla měřena bez bičíků. Pomocí programu R 2.10. byly vypočítány či vyhledány některé základní popisné statistiky (rozpětí, aritmetický průměr), jako charakteristika variability byla počítána směrodatná odchylka. Tyto údaje byly vypočítány nejen pro jednotlivé izoláty, ale i pro předpokládané druhy. U protargolových preparátů byl měřen od každého druhu pouze jeden izolát. Měřené údaje jsou ve výsledcích udávány ve formátu ARITM. PRŮMĚR ± SMĚRODATNÁ ODCHYLKA (MIN – MAX).

3.3. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Vzorky byly připravovány chemickou cestou. Samostatně byla prováděna pouze primární fixace vzorků, navazující kroky přípravy preparátů byly prováděny servisním způsobem v Laboratoři elektronové mikroskopie PŘF UK.

3.3.1. Příprava preparátů pro TEM

Primární fixace vzorků

Použité chemikálie: 2,5% roztok glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru (fixační roztok); CaCl_2 ; destilovaná voda.

Postup:

Fixační roztok (2,5% roztok glutaraldehydu v 0,1M kakodylátovém pufru) byl připraven pracovníky Laboratoře elektronové mikroskopie. Navíc do něj byl ale přidáván chlorid vápenatý. Zabraňuje totiž poškození mitochondrií a jejich derivátů, může však způsobit změny u jiných struktur buňky (Nebesářová 2002).

Fixační roztok byl poté obohacen o chlorid vápenatý do finální koncentrace 5mM roztoku. K 1300 μl upraveného fixačního roztoku na ledu byl přidán stočený buněčný pelet (1000 – 1500 G po dobu 10 minut) resuspendovaný v minimálním množství původního média. Vzorek byl poté ponechán na

ledu (nebo ve 4 °C) po dobu alespoň 4 hodin a předán pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie.

Následující kroky přípravy preparátů na pozorování v TEM byly prováděny pracovníky Laboratoře elektronové mikroskopie PŘF UK, a to servisním způsobem. Vzhledem k tomu, že existuje více možností přípravy, uvádím používaný postup, přestože jsem jej sám neprováděl:

Sekundární fixace vzorků (postfixace)

Použité chemikálie: 0,1M kakodylátový pufr; 2% roztok OsO_4 v 0,1M kakodylátovém pufru.

Postup: Vzorek byl nejprve vyprán v 0,1M kakodylátovém pufru 3x po 15 minutách. Poté byl za účelem fixace a vizualizace buněčných membrán po dobu 3 – 4 hodin postfixován pomocí 2% roztoku OsO_4 v 0,1M kakodylátovém pufru. Po skončení postfixace byl vzorek důkladně vyprán v 0,1M kakodylátovém pufru, a to 3x po 15 minutách.

Odvodnění vzorků

Použité chemikálie: aceton, ethanol, destilovaná voda.

Protože použité zalévací médium není mísitelné s vodou, je nutné před zaléváním vzorek zcela odvodnit (nahradit vodu ve vzorku acetonem). Dehydratace bývá zdrojem řady artefaktů, například vyluhování lipidů a proteinů a ztráty až 40% objemu. (Nebesářová 2002).

Postup: Preparát se odvodňuje vzestupnou ethanolovou řadou (35%, 50%, 70%, 80%, 96 a 100%, po 15 minutách). Vzorky je nakonec nutné převést přes 70%, 50% a 30% roztok ethanolu v acetonu do 100% neutrálního acetonu (opět po 15 minutách).

Zalévání vzorků

Použité chemikálie: Poly/Bed 812 (Polysciences), Araldite 502 (Polysciences), DDSA (Polysciences), DMP 30 (Polysciences), čistý aceton.

Postup: Vzorek se postupně převede z acetonu do čerstvě namíchané pryskyřice (Poly/Bed 812/Araldite 502), a to přes řadu 2:1, 1:1 a 1:2 objemových dílů (čistý aceton : pryskyřice). Doba ponechání vzorku v jednotlivých směsích acetonu s pryskyřicí je po řadě 2 hodiny, 4 hodiny, 12 hodin. Poté se vzorek převede do čisté pryskyřice (3x po 12 hodinách) a zalije se čistou pryskyřicí do formy. Nakonec se pryskyřice polymerizuje v termostatu při 65 °C po dobu 48 hodin.

Příprava ultratenkých řezů

Postup: Vzorky byly řezány na ultratenké řezy s použitím ultramikrotomu *Ultracut E* (Reichert Inc., USA). Ve většině případů byly sítky navíc potaženy formvarovými blánami, které brání prohýbání řezů na sítkách, na druhou stranu však snižují kontrast (Nebesářová 2002).

Kontrastování ultratenkých řezů

Použité chemikálie: *octan uranylu, citrát olovnatý, ethanol, destilovaná voda, pecičky KOH nebo NaOH.*

Ultratenké řezy byly kontrastovány 2 – 3% roztokem octanu uranylu (ve tmě a v ethanolové atmosféře) a citrátem olovnatým (atmosféra se sníženým obsahem CO₂). Octan uranylu kontrastuje zejména nukleové kyseliny a také proteiny, citrát olovnatý zvyšuje kontrast membrán, proteinů, nukleových kyselin a glykogenu (Nebesářová 2002).

3.3.2. Pozorování ultratenkých řezů a jejich fotodokumentace

K pozorování připravených ultratenkých řezů byl využíván transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011 (Jeol Ltd., Japonsko). Preparáty byly snímány digitálně pomocí CCD kamery Veleta s akvizičním softwarem Olympus Soft Imaging Solutions (Olympus, Japonsko). Získané fotografie byly upravovány pomocí softwaru CorelDraw Graphics Suite X3.

3.4. Molekulárně – biologické techniky

3.4.1. Izolace DNA

Použité kity: *DNeasy Blood® & Tissue Kit (Qiagen, Německo); ZR Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research, USA).*

Postup:

1. Odebrat cca 1,5 – 2 ml dobře narostlé kultury ze dna zkumavky (včetně sedimentu), následným invertováním a jemným vortexováním uvolnit buňky ze sedimentu.
2. Nechat usadit sediment (cca 5 – 10 minut v závislosti na velikosti zrněk sedimentu) a odebrat supernatant do nové mikrozkušavky.
3. Stočit supernatant 10 minut na 500 G (měňavky) nebo 1000 G (bičíkovci).
4. Odebrat supernatant tak, aby byl zbytkový objem kapaliny ve zkumavce 200 µl.
5. Resuspendovat pelet ve zbylé kapalině a zahájit izolaci celkové DNA dle protokolu:
 - a. „*Purification of total DNA from animal blood or cells, spin – column protocol*“ (DNeasy Blood® & Tissue Kit).
 - b. „*Cell suspension and proteinase K digested samples*“ (ZR Genomic DNA II Kit™).

Přítomnost huminových kyselin v některých sladkovodních kulturách byla řešena izolací DNA až po více než deseti cyklech pasážování. Nebylo přitom používáno zcela čiré médium ATCC 802, nýbrž

během přípravy bylo v médiu ponecháno malé množství pevného zbytku *Cereal Grass Media*. Původní sediment tak byl postupně nahrazen sterilním pevným zbytkem *Cereal Grass Media*. Ten se dá ze vzorku snadno odstranit (viz postup výše) a neuvolňují se z něj ve významnějším množství látky, které by blokovaly následnou PCR. Izolovaná DNA se uchovává při -20 °C.

3.4.2. Amplifikace DNA a purifikace PCR produktů

Amplifikace cílových fragmentů DNA byla prováděna metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím specifických primerů (nově designovaných i již publikovaných). U všech úspěšně použitých dvojic primerů (viz **tab. 1**) bylo zkoušeno různé časové nastavení jednotlivých kroků PCR a prováděna gradientová PCR (teplota nasedání primerů od 40 °C do 65 °C). Níže jsou uvedeny jen optimální podmínky reakce.

Použité chemikálie při PCR:

Varianta 1: *LA DNA polymerases Mix v koncentraci 5U.μl⁻¹ (Top-Bio, ČR); 10x koncentrovaný LA PCR pufr s přidaným MgCl₂ (Top-Bio, ČR); DMSO (Top-Bio, ČR); sterilizovaná MiliQ H₂O; PCR dNTP mix – 10mM roztok každého z nukleotidů (Top-Bio, ČR); specifické primery.*

Varianta 2: *Rekombinantní Taq DNA polymeráza v koncentraci 5U.1μl⁻¹ (Thermo Fisher Scientific - MBI Fermentas); 10x koncentrovaný Taq pufr bez MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific - MBI Fermentas); 25mM roztok MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific - MBI Fermentas); dNTP mix – 2mM roztok každého z nukleotidů (Thermo Fisher Scientific - MBI Fermentas); sterilizovaná MiliQ H₂O, specifické primery.*

Varianta 3: *Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR); sterilizovaná MiliQ H₂O; specifické primery.*

Další použité chemikálie a kity: *TBE pufr (89 mM Tris HCl, 89 mM kyselina boritá a 2 mM EDTA); agaróza; MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen); miliQ H₂O; loadovací pufr; ethidiumbromid; GeneRuler 100bp Plus DNA ladder (MBI Fermentas).*

Tab. 1: Úspěšně použité primery při amplifikaci cílových lokusů z jaderných genomů heteroloboseí.

Název primeru	Designováno	Sekvence 5' - 3' (orientace)	Cílový úsek
MedlinA	Medlin <i>et al.</i> 1988	AYCTGGTTGAYYTGCCAG (F)	SSU rRNA
MedlinB	Medlin <i>et al.</i> 1988	TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC (R)	SSU rRNA
HeterF1	tato práce	GCTTATTTTCRAAGATTAAGCCATGYAAA (F)	SSU rRNA
HeterR1k	tato práce	AAYTCAGGGACGTAATCATT (R)	SSU rRNA
ATUBsecFYoon	Yoon <i>et al.</i> 2008	TTGTACTGTCYTNARCAAG (F)	ATUB
ATUBsecRYoon	Yoon <i>et al.</i> 2008	ACGTACCAGTGNACRAANGC (R)	ATUB
ATUB A	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	RGTNGGNAAYGCNTGYTGGA (F)	ATUB
ATUB B	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	CCATNCCYTCNCCNACNTACCA (R)	ATUB
BTUB A	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	GCAGGNCARTGYGGNAAYCA (F)	BTUB
BTUB B	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	AGTRAAYTCCATYTCRTCCAT (R)	BTUB

Příprava reakčních směsí je shrnuta v **tabulkách 2, 4, 6, 8**. Vlastní PCR probíhala v termocykléru MyCycler™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories), nastavení je uvedeno v **tabulkách 3, 5, 7, 9**. Výsledky PCR byly analyzovány pomocí **gelové elektroforézy** v TBE pufru (89 mM Tris HCl, 89 mM kyselina boritá a 2 mM EDTA) na 1% horizontálním agarovém gelu s použitím 2 μ l standardu *GeneRuler 100bp Plus DNA ladder* (MBI Fermentas) o koncentraci 0,1 μ g. μ l⁻¹. DNA byla vizualizována pomocí ethidiumbromidu v procházejícím UV světle. Finální koncentrace ethidiumbromidu v agarózovém gelu byla 0,5 μ g.ml⁻¹ a použitý gradient napětí cca 12 V.cm⁻¹. V případě, že se na gelu objevil jediný fragment, byl purifikován a přímo sekvenován (viz **kap. 3.4.4.**). Pokud však došlo během PCR k nasednutí primerů na více lokusů, musely být fragmenty z gelu vyřezány, purifikovány, zaklonovány do plasmidů a namnoženy v bakteriích (viz **kap. 3.4.3.**).

Tab. 2: Složení reakčních směsí pro amplifikaci genu pro SSU rRNA pomocí primerů MedlinA a MedlinB.

Chemikálie (varianta 1)	μ l	Chemikálie (varianta 2)	μ l
Templátová DNA	3 – 5	Templátová DNA	3 – 5
10x LA pufr s MgCl ₂	5	10x Taq pufr bez MgCl ₂	5
sterilní DMSO	1	MgCl ₂ (25mM)	3,75
dNTP (10mM)	1,5	dNTP (2mM)	2,5
MedlinA (10 pmol. μ l ⁻¹)	1,25	MedlinA (10 pmol. μ l ⁻¹)	1,25
MedlinB (10 pmol. μ l ⁻¹)	1,25	MedlinB (10 pmol. μ l ⁻¹)	1,25
LA polymerázy (5U. μ l ⁻¹)	0,5	Taq polymeráza (5U. μ l ⁻¹)	0,5
H ₂ O	do 50	H ₂ O	do 50

Při **purifikaci PCR** produktů byl použit *MinElute® PCR Purification Kit* (Qiagen) a bylo postupováno dle protokolu „*MinElute PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge*“. Téměř vždy bylo

přidáváno 10 µl 3M roztoku octanu sodného spolu s PB pufrem. DNA byla eluována do 10 – 20 µl elučního pufru (10mM roztoku Tris HCl) a uchovávána v -20 °C. **Koncentrace purifikované DNA** byla určována pomocí přístroje *NanoDrop®* (Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products).

Tab. 3: Nastavení PCR pro amplifikaci SSU rDNA pomocí primerů MedlinA a MedlinB.

Počet cyklů (varianta 1)	Teplota (varianta 1)	Čas (varianta 1)	Počet cyklů (varianta 2)	Teplota (varianta 2)	Čas (varianta 2)
1	94 °C	1 min	1	94 °C	4 min
31	94 °C	15 s	31	94 °C	1 min
	50 °C	1 min		50 °C	1 min
	68 °C	2 – 4 min		72 °C	4 min
1	72 °C	15 – 45 min	1	72 °C	15 – 45 min

Tab. 4: Složení reakčních směsí pro amplifikaci SSU rDNA pomocí primerů HeterF1 a HeterR1k.

Chemikálie (varianta 1)	µl	Chemikálie (varianta 2)	µl
Templátová DNA	3 – 5	Templátová DNA	3 – 5
10x LA pufr s MgCl ₂	5	10x Taq pufr bez MgCl ₂	5
sterilní DMSO	1	MgCl ₂ (25mM)	3,75
dNTP (10mM)	1,5	dNTP (2mM)	2,5
HeterF1 (10 pmol.µl ⁻¹)	2,5	HeterF1 (10 pmol.µl ⁻¹)	2,5
HeterR1k (10 pmol.µl ⁻¹)	2,5	HeterR1k (10 pmol.µl ⁻¹)	2,5
LA polymerázy (5U.µl ⁻¹)	0,5	Taq polymeráza (5U.1µl ⁻¹)	0,5
H ₂ O	do 50	H ₂ O	do 50

Tab. 5: Nastavení PCR pro amplifikaci SSU rDNA pomocí primerů HeterF1 a HeterR1k.

Počet cyklů (varianta 1)	Teplota (varianta 1)	Čas (varianta 1)	Počet cyklů (varianta 2)	Teplota (varianta 2)	Čas (varianta 2)
1	94 °C	1 min	1	94 °C	4 min
31	94 °C	15 s	31	94 °C	1 min
	60 °C	1 min		60 °C	1 min
	68 °C	2 – 4 min		72 °C	4 min
1	72 °C	15 – 45 min	1	72 °C	15 – 45 min

Tab. 6: Složení reakční směsi primárního a sekundárního PCR pro amplifikaci genu pro α -tubulin.

Chemikálie (primární PCR)	μl	Chemikálie (sekundární PCR)	μl
Templátová DNA	5	Produkt primární PCR	0,5
10x LA pufr s MgCl_2	5	10x LA pufr s MgCl_2	5
sterilní DMSO	1	sterilní DMSO	1
dNTP (10mM)	1,5	dNTP (10mM)	1,5
ATUBA (20 pmol. μl^{-1})	3	ATUBsecFYoon (20 pmol. μl^{-1})	3
ATUBB (20 pmol. μl^{-1})	3	ATUBsecFYoon (20 pmol. μl^{-1})	3
LA DNA polymerázy (5U. μl^{-1})	0,5	LA DNA polymerázy (5U. μl^{-1})	0,5
H_2O	31	H_2O	35,5

Tab. 7: Nastavení primární a sekundární PCR pro amplifikaci genu pro α -tubulin.

Počet cyklů	Teplota	Čas
1	94 °C	1 min
35	94 °C	15 s
	50 °C	1 min
	68 °C	2 min
1	72 °C	15 – 45 min

Tab. 8: Složení reakční směsi pro amplifikaci genu pro β -tubulin.

Chemikálie	μl
Combi PPP Master Mix	25
BTUBA (25 pmol. μl^{-1})	2,5
BTUBB (25 pmol. μl^{-1})	2,5
H_2O	17
Templátová DNA	3

Tab. 9: Nastavení PCR pro amplifikaci genu pro β -tubulin.

Počet cyklů	Teplota	Čas
1	94 °C	4 min
35	94 °C	1 min
	56,8 °C	1 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	30 min

3.4.3. Klonování PCR produktů

Vyřezání a přečištění amplifikované DNA z gelu

Použité kity a chemikálie: *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA); agaróza (Lachema, ČR); TBE pufr (89 mM Tris HCl, 89 mM kyselina boritá a 2 mM EDTA); ethidiumbromid; GeneRuler 100bp Plus DNA ladder (MBI Fermentas, UK); miliQ H₂O.*

Pokud došlo během PCR k nasednutí primerů na více lokusů (popřípadě se cílové úseky amplifikovaly jen velmi slabě) musely být fragmenty odpovídající délky z gelu vyřezány a pomocí *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* přečištěny. Při vyřezávání byl narozdíl od rutinní gelové elektroforézy používán 1,5% agarózový gel. Přečištěná DNA byla eluována do 10 μ l sterilní miliQ H₂O a její koncentrace byla určována pomocí přístroje *NanoDrop®* (Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products).

Příprava kompetenčních buněk

Použité kity a chemikálie: *0,1M roztok CaCl₂; 0,1M roztok MgCl₂; 0,1M CaCl₂ ve 14% glycerolu; destilovaná voda; LB médium.*

Komerčně dodávané kompetenční bakterie *Escherichia coli JM109 Competent Cells* (Promega, USA) byly vysety na Petriho misky s živným médiem (utuhlá směs agaru a LB média). Po 16 hodinách inkubace ve 37 °C byly buňky z jedné vybrané kolonie inokulovány do 5 ml LB média a inkubovány 16 hodin ve 37 °C. Z takto narostlých bakterií bylo inokulováno 2,5 ml buněčné suspenze 2x do 250 ml LB média. Obě založené kultury se inkubovaly ve 37 °C a na spektrofotometru byla sledována jejich optická densita. Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ 0,4 až 0,6 byla inkubace zastavena a pokračovalo se dle následujícího postupu:

1. Buněčnou suspenzi (500 ml) centrifugovat 10 minut na 2800 G tak, aby byl na konci procesu veškerý buněčný pelet umístěn v jediné 50ml zkumavce.

2. K buněčnému peletu na ledu přidat sterilní 0,1M roztok MgCl_2 do celkového objemu 50 ml a pelet rozmíchat v roztoku.
3. Centrifugovat při 4 °C 10 minut na 440 G.
4. Odstranit supernatant a doplnit na ledu do 50 ml 0,1M roztokem CaCl_2 .
5. Nechat inkubovat na ledu (ve 4 °C) po dobu 20 minut
6. Centrifugovat při 4 °C 10 minut na 440 G.
7. Odstranit supernatant a pelet rozmíchat ve 20 ml 0,1M CaCl_2 ve 14% glycerolu (vše na ledu).
8. Rozplnit do sterilních mikrozkušavek po 200 μl a uložit do tekutého dusíku, uchováváme při -80 °C.

Příprava rekombinantních plasmidů a transformace kompetenčních buněk

Použité kity a chemikálie: *pGEM® T Easy Vector System I (Promega, USA); miliQ H_2O ; Luria-Bertani médium (příprava viz **kap. 3.1.1.**).*

Pro přípravu rekombinantních plasmidů byl použit *pGEM® T Easy Vector System I*, postupovalo se podle protokolu doporučeného výrobcem. Ligační směs byla inkubována po dobu 24 hodin ve 4 °C a poté byl celý objem směsi přimíchán ke kompetenčním bakteriím. Kompetenční buňky byly obohaceny o rekombinantní plasmid následovně:

1. Ke 200 μl kompetenčních buněk přidat 10 μl ligační směsi s rekombinantními plasmidy a nechat 20 minut na ledu (při 4 °C).
2. 45 – 50 sekund teplotně vložit zkumavky s transformovanými bakteriemi do vodní lázně o teplotě 42 °C.
3. Přenést na 2 minuty na led (4 °C).
4. Doplnit směs s transformovanými buňkami LB médiem do celkového objemu 1 ml a nechat buňky 90 minut růst (třepat ve 37 °C).

Pomocné testování úspěchu rekombinace plasmidů a transformace buněk

Použité kity a chemikálie: *isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0,1M sterilní roztok); 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal, sterilní roztok, 50 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); ampicilin (roztok 200 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); LB médium (příprava viz **kap. 3.1.1.**).*

Pro pomocné testování úspěchu rekombinace fragmentů s *pGEM®* plasmidy se používá blue/white screening test (*pGem®* plasmid je otevřen pro rekombinaci s fragmentem uvnitř genu pro β -galaktozidázu). Pro pomocné testování transformace buněk *pGEM®* plasmidy se používá test

rezistence na ampicilin (pGEM® plasmid nese gen pro rezistenci vůči ampicilinu). Tyto dva testy provádíme současně:

1. Na připravené Petriho misky s živným médiem (utuhlá LB médium s přidavkem rozpuštěného agaru) rozetřít 100 μl 0,1M roztoku IPTG, 20 μl roztoku X-gal o koncentraci 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 25 μl roztoku ampicilinu o koncentraci 200 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.
2. Na takto připravené médium nanést 150 μl transformovaných bakterií a kultivovat 16 hodin při 37 °C.
3. Bílé kolonie označit pro následné colony PCR (tj. kolonie, které vznikly namnožením bakterie s plasmidem, jenž má gen pro β -galaktozidázu přerušen vneseným fragmentem DNA).

Colony PCR

Použité kity a chemikálie: *Combi PPP Master Mix (Top-Bio, ČR); primery SP6 a T7; miliQ H₂O; ampicilin; Luria-Bertani médium (příprava viz **kap. 3.1.1**); agaróza (Lachema, ČR); TBE pufr (89 mM Tris HCl, 89 mM kyselina boritá a 2 mM EDTA); GeneRuler 100bp Plus DNA ladder (MBI Fermentas); ethidiumbromid.*

Z vhodných bakteriálních kolonií (obvykle 6 – 8) byla špičkou pipety odebrána část buněčné masy a přenesena do 9 μl sterilní miliQ H₂O. V této buněčné suspenzi došlo vlivem střídání teplot (viz **tab. 10**) k rozpadu buněčných stěn, degradaci DNáz a uvolnění vlastní DNA z buněk. Po provedení degradace buněk bylo do každého vzorku přidáno 11 μl *Combi PPP Master Mix* s přidávanými 5 pmol primeru SP6 a 5 pmol primeru T7 (primery nasedající na plasmid v bezprostřední blízkosti vneseného fragmentu, sekvence viz **tab. 11**).

Tab. 10: Nastavení termocykléru pro degradaci buněk

Počet cyklů	Teplota	Čas
1	96 °C	5 min
	50 °C	1,5 min
	96 °C	1,5 min
	45 °C	1 min
	96 °C	1 min
	40 °C	1 min

S takto připravenou reakční směsí byla provedena PCR podle **tab. 3** (varianta 2). Délka výsledného PCR produktu byla ověřena gelovou elektroforézou na 1% horizontálním agarózovém gelu. Bylo vytipováno několik kolonií (obvykle 2 – 4), které byly naočkovány do zkumavky se 4 ml LB média s 800 µg ampicilinu. Po 16 hodinách inkubace ve 37 °C byla z těchto bakteriálních kultur provedena izolace plasmidů.

Izolace plasmidů z transformovaných buněk *E. coli*

Použité kity a chemikálie: *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega); ZR Plasmid Miniprep™-Classic (Zymo Research); miliQ H₂O.*

Pro izolační proceduru byly použity 3 ml narostlé bakteriální kultury. Izolace plasmidů probíhala s použitím *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) dle protokolu výrobce (s použitím mikrocentrifugy). Později byl používán též kit *ZR Plasmid Miniprep™-Classic* (Zymo Research), postupovalo se dle přiloženého protokolu. DNA byla eluována do 25 µl sterilní miliQ H₂O. Izolovaná DNA se uchovávala pro další použití v -20 °C a posléze byla sekvenována postupem uvedeným v **kap. 3.4.4.**

3.4.4. Sekvence DNA

Použité kity a chemikálie: *miliQ H₂O; specifické primery (viz **tab. 11**); ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA); 3M roztok octanu sodného; ethanol.*

Tab. 11: Primery používané pro sekvenaci

Název primeru	Citace	Sekvence 5' - 3'	Cílový úsek
MedlinA	Medlin <i>et al.</i> 1988	AYCTGGTTGAYYTGCCAG	SSU rDNA
MedlinB	Medlin <i>et al.</i> 1988	TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC	SSU rDNA
HeterF1	tato práce	GCTTATTTTCRAAGATTAAGCCATGYAAA	SSU rDNA
HeterR1k	tato práce	AAYTCAGGGACGTAATCATT	SSU rDNA
577F	Elwood <i>et al.</i> 1985	GCCAGCMGCCGCGGT	SSU rDNA
577R	Elwood <i>et al.</i> 1985	ACCGCGGCKGCTGGC	SSU rDNA
1125F	Littlewood & Smith 1995	GAAACTYAAAGGAAT	SSU rDNA
1125R	Littlewood & Smith 1995	ATTCCTTTTRAGTTTC	SSU rDNA
BTUB A	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	GCAGGNCARTGYGGNAAYCA	BTUB
BTUB B	Edgcomb <i>et al.</i> 2001	AGTRAAYTCCATYTCRTCCAT	BTUB
ATUBsecFYoon	Yoon <i>et al.</i> 2008	TTGTACTGCTNGARCAYG	ATUB
ATUBsecRYoon	Yoon <i>et al.</i> 2008	ACGTACCAAGTGNACRAANGC	ATUB
SP6	Wallace <i>et al.</i> 1981	GATTTAGGTGACACTATAG	pGem plasmid
T7	Wallace <i>et al.</i> 1981	TAATACGACTCACTATAGGG	pGem plasmid

Vzorky pro sekvenační reakci byly připravovány smícháním templátové DNA, primeru (viz **tab. 11**) a sterilní miliQ H₂O do celkového objemu 14 µl. Množství templátové DNA ve vzorku pro sekvenační reakci bylo určeno podle délky sekvenovaného fragmentu (100 ng DNA na 1000 bp délky sekvence). V případě sekvenace plasmidové DNA bylo množství templátové DNA zvýšeno na 400 – 500 ng. Primer se do reakční směsi přidával v množství 3,2 pmol (SP6, T7, MedlinA, MedlinB, 577F, 577R, 1125F, 1125R), 0,64 pmol (HeterF1, HeterR1k) nebo 16 pmol (ATUBsecFYoon, ATUBsecRYoon, BTUBA, BTUBB).

Vzorky byly poté předány do Laboratoře sekvenace DNA PŘF UK, kde byly přidány zbylé chemikálie nutné pro provedení sekvenační reakce a provedena vlastní sekvenační reakce. DNA byla vysrážena ethanolem a octanem sodným a nakonec zde byla DNA analyzována metodou kapilární elektroforézy na čtyřkapilárovém sekvenátoru *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA).

3.5. Práce se sekvencemi a tvorba fylogenetických stromů

3.5.1. Vyhodnocování sekvencí a tvorba alignmentu

Pro prvotní zjišťování podobnosti osekvenovaných fragmentů s již publikovanými sekvencemi byl používán *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) a nastavení „*nucleotide blast*“ nebo „*blastx*“. Jako zdrojová databáze byla použita GenBank databáze neredundantních sekvencí (*blast.ncbi.nih.gov*).

Jednotlivé osekvenované fragmenty DNA byly v programu SeqMan II 3.6.1. (DNASTar) spojovány do řetězce po sobě jdoucích oblastí (kontigu). Z konečné, složené sekvence (kontigu) byly odstraněny sekvence použitých primerů pro amplifikaci. V případech, kdy bylo nutné amplifikované fragmenty klonovat, byla vždy výsledná sekvence získána tvorbou kontigu s přihlédnutím k alespoň dvěma osekvenovaným klonům daného úseku na DNA.

Získané sekvence byly při tvorbě datasetu doplněny již publikovanými sekvenčními daty příslušných genů či proteinů z databáze GenBank. Vhodné sekvence pro tvorbu datasetu byly vytypovány jednak na základě již publikovaných fylogenetických analýz, jednak pomocí vyhledávání podobných sekvencí s použitím nástroje BLAST.

Alignment SSU rDNA byl vytvořen metodou MAFFT (Katoh *et al.* 2002) pomocí internetového serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Byl vybrán algoritmus G-ins-i, ostatní parametry nastavení nebyly měněny. Výsledný alignment byl ručně upraven v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). V případě alignmentu SSU rDNA pro analýzu heteroloboseí byla sekvence SSU rDNA druhu *Solimitrus palustris* přidána k takto vytvořenému alignmentu ručně. Tato sekvence je totiž velice krátká. Sekvence proteinových genů byly převedeny na aminokyseliny a alignovány ručně.

Z alignmentů byly následně odstraněny introny (v případě SSU rDNA) a variabilní oblasti, jejichž homologie napříč sekvencemi byla nejasná. U neúplných sekvencí byl začátek a konec nahrazen neurčitými aminokyselinami nebo nukletidy (x, resp. n).

Celkem bylo připraveno 7 různých datasetů:

1. Dataset sekvencí SSU rDNA anaerobních heteroloboseí (44 OTU, 1357 pozic).
2. Dataset sekvencí SSU rDNA heteroloboseí včetně PC4AM (84 OTU, 1211 pozic).
3. Dataset sekvencí SSU rDNA heteroloboseí bez PC4AM (83 OTU, 1246 pozic).
4. Dataset sekvencí SSU rDNA eukaryot (48 OTU, 1001 pozic).
5. Aminokyselinový dataset genu pro α -tubulin eukaryot (36 OTU, 373 pozic).
6. Aminokyselinový dataset genu pro β -tubulin eukaryot (44 OTU, 356 pozic).
7. Dataset kombinovaný ze sekvencí SSUrDNA a genů pro α - a β -tubulin (48 OTU, 1730 pozic).

Vzhledem k velké časové i hardwarové náročnosti nebyla většina fylogenetických analýz těchto datasetů prováděna na běžném osobním počítači, nýbrž na výpočetním klastru *darwin.natur.cuni.cz* s využitím dávkového systému TORQUE. Tento výpočetní klastr je umístěn na PřF UK.

3.5.2. Fylogenetická analýza SSU rDNA

Fylogenetické stromy SSU rDNA byly konstruovány metodami *Maximum likelihood* (ML) a *Bayesian phylogenetic inference* v programech RAXML 7.2.6., PAUP* 4.0b10 a MrBayes 3.1.2. (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Swofford 2002; Stamatakis 2006). Při ML analýzách v programu RAXML (datasety 1 – 4) byl vždy použit model GTRGAMMAI. Počet bootstrapových replikátů byl ve všech případech 1000 (`osc-mpiexec raxmlHPC-PTHREADS-SSE3 -s „input“ -m GTRGAMMAI -n „output“ -b 1323 -# 1000 -T 4`). Ze získaných bootstrapových stromů byl v programovém balíku Phylip 3.69 (Felsenstein 1989) vytvořen konsenzuální strom, v jehož uzlech byly číselné hodnoty bootstrapu (nástroj CONSENSE; zachovány přednastavené hodnoty). Získané hodnoty bootstrapu pak byly s využitím softwaru CorelDraw Graphics Suite X3 a TREEVIEW 1.6.6. (Page 1996) doplněny do uzlů stromu základní topologie.

V programu PAUP* byla z časových důvodů pouze zkonstruována ML topologie fylogenetického stromu datasetu 2. Jako substituční model byl použit TrN + I + Γ doporučený *Hierarchical likelihood ratio test* v programu ModelTest 3.7. (Posada & Crandall 1998). Stromy byly konstruovány heuristickým hledáním s deseti replikáty postupného náhodného přidávání sekvencí (hsearch

addseq=random start=stepwise, ostatní parametry zůstaly nezměněny). Strom byl „swapován“ pomocí algoritmu TBR (přednastavený parametr).

Bayesian phylogenetic inference SSU rDNA (datasety 1 – 4) proběhla v programu MrBayes. Kromě nastavení modelu GTR + I + Γ + covarion (lset nst=6 rates=invgamma covarion=yes) bylo zachováno původní nastavení programu. Počet generací *Monte Carlo Markov chain* se u jednotlivých analýz lišil. Byl zvolen tak, aby průměrná odchylka obou souběžně probíhajících běhů byla menší než 1 % v posledních 75 % generací stromů (konkrétně je u každé analýzy uveden v **kap. 4.3.**). Následně byla stanovena *burn-in* perioda jako prvních 25 % stromů. Tyto stromy pak byly z analýzy odstraněny a ze zbylých stromů byl vypočítán konsenzuální strom. Pro jednotlivé větve byly také stanoveny hodnoty jejich posteriorní pravděpodobnosti (*Bayesian posterior probability*).

3.5.3. Fylogenetická analýza genů pro α - a β -tubulin

Aminokyselinové datasety byly analyzovány metodou *Maximum likelihood* v programu RAxML 7.2.6 (Stamatakis 2006). Pro stanovení vhodného modelu u aminokyselinových sekvencí byl použit server ProtTest (darwin.uvigo.es/software/prottest_server.html; Abascal *et al.* 2005). Zatímco pro fylogenetickou analýzu datasetu 5 byl z dostupných modelů doporučen LG + I + Γ + F (-m PROTGAMMAILGF), pro analýzu datasetu 6 byl doporučen LG + Γ + F (-m PROTGAMMALGF). Na základě výsledků analýz datasetu 5 – 6 byly vybrány OTU pro finální dataset konkatenátu (metoda výběru OTU viz **kap. 3.5.4**). Z prostorových důvodů nejsou stromy konstruované z datasetu 5 a 6 v diplomové práci uvedeny. Nastavení RAxML bylo až na použitý model stejné jako v **kap. 3.5.2**.

3.5.4. Fylogenetická analýza konkatenátu SSU rDNA a genů pro α - a β -tubulin

Při výběru taxonů do finálního datasetu pro konkatenát bylo analyzováno více sekvencí. Sekvence, které měly v prvotních analýzách jednotlivých genů extrémně dlouhé větve, byly odstraněny. V rámci heteroloboseí byly ve finálním alignmentu pro konkatenát ponechány všechny taxony, u nichž je známa sekvence SSUrDNA a sekvence alespoň jednoho z genů pro α - a β -tubulin. Jedinou výjimkou byla *Sawyeria marylandensis*, která byla z datasetu také odstraněna, protože její sekvence α -tubulinu vytváří velmi dlouhou větev a odvíjí se na jiném místě fylogenetického stromu, nežli ostatní Heterolobosea. Při homologizaci pozic sekvencí α -tubulinu byly zachovány i sekvence paralogu, který mají společný Opisthokonta, parabasalidi, diplomonády, rod *Andalucia* a apusomonády (viz Simpson *et al.* 2008). Ve finálním alignmentu konkatenátu však tyto sekvence byly nahrazeny neurčitými aminokyselinami.

Dataset konkatenátu genů pro SSU rRNA, α - a β -tubulin (dataset 7, vznikl složením datasetů 4 – 6) byl analyzován pomocí metod *Maximum likelihood* a *Bayesian phylogenetic inference* v programech RAxML 7.2.6. a MrBayes 3.1.2. (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Stamatakis 2006). Dataset byl vždy rozdělen do tří *partitions* (1 gen = 1 *partition*).

Pro analýzu metodou ML v programu RAxML byl nejprve vytvořen soubor partitions.txt (DNA, gene1 = 1-1001 LG, gene2 = 1002-1374 LG, gene3 = 1375-1730). V programu RAxML nelze zadat různé komplexní modely pro různé geny, proto byl zvolen model GTRGAMMAIF (pro nukleotidy), resp. PROTGAMMAILGF (pro aminokyseliny). Při následné bootstrapové analýze bylo zkonstruováno 1000 bootstrapových replikátů a podle souboru partitions.txt byl dataset rozdělen do jednotlivých *partitions* (-s „input“ -m GTRGAMMAIF -n „output“ -b 1323 -# 1000 -q partitions.txt).

MrBayes narozdíl od RAxML neobsahuje LG model, byl tedy použit model WAG + Γ + I + covarion a jako nukleotidový model GTR + Γ + I + covarion. Dataset byl opět rozdělen na 3 *partitions*, pro každý gen byly tedy modelovány parametry zvlášť (délka větví, gamma distribuce, proporce invariabilních pozic a covarion model). Nastavení programu bylo následující: charset SSU = 1-1001; charset atub = 1002-1374; charset btub = 1375-1730; partition genes = 3: SSU, atub, btub; set partition=genes; lset applyto=(1) nst=6 rates=invgamma covarion=yes; lset applyto=(2) rates=invgamma covarion=yes; lset applyto=(3) rates=invgamma covarion=yes; prset applyto=(2) aamodelpr=fixed(wag); prset applyto=(3) aamodelpr=fixed(wag); unlink revmat=(all) statefreq=(all) shape=(all) pinvar=(all) switchrates=(all) brlen=(all); prset applyto=(all) ratepr=variable; mcmc ngen=100000000 samplefreq=100 printfreq=1000;

3.5.5. AU TEST

AU test (Shimodaira 2002) slouží k testování, zda je některá topologie fylogenetického stromu signifikantně horší než ta, která je hodnocena jako nejlepší. V této práci byl AU test použit při ověřování, zda je možno vyloučit na hladině $\alpha=0,05$, že PC4AM a skupina Psalteriomonadidae tvoří monofylum, a to na datasetu SSUrDNA (dataset 2). Stanovené hypotézy byly tedy následující: H0 – nelze vyloučit, že PC4AM a skupina Psalteriomonadidae tvoří monofylum; H1 – PC4AM a Psalteriomonadidae netvoří monofylum.

Následující postup vychází z práce Kolísko *et al.* (2008). Nejprve byl v závorkové podobě definován *constraint* (omezení) – skupina PC4AM a Psalteriomonadidae jako nerozlišené monofylum. V programu PAUP* (Swofford 2002) byl následně vygenerován nejlepší strom, který odpovídá tomuto omezení. Jako substituční model byl použit TrN + I + Γ doporučený *Hierarchical likelihood ratio test* provedený v programu ModelTest 3.7. (Posada & Crandall 1998). Strom byl konstruován heuristickým

hledáním s deseti replikáty postupného náhodného přidávání sekvencí (hsearch addseq=random start=stepwise cons = „omezení“ enforce=yes, ostatní parametry zůstaly nezměněny). Strom byl „swapován“ pomocí algoritmu TBR.

Následně bylo ze zvoleného datasetu vytvořeno 10 nových datasetů (datasety 2a – 2j), které se od datasetu 2 lišily pouze v pořadí OTU (v každém z těchto datasetů bylo zcela náhodné pořadí OTU). V programu PAUP* byly provedeny nezávislé analýzy datasetů 2a – 2j. Každá analýza proběhla s jediným replikátem heuristického hledání a s přidáváním sekvencí podle jejich pořadí. Z každé analýzy bylo uloženo 500 nejlepších stromů (hsearch start=stepwise addseq=asis nbest=500, ostatní parametry zůstaly nezměněny). Z výsledných 5000 nejlepších stromů byly odstraněny duplikáty. Zůstalo tak celkem 3498 unikátních topologií, z kterých bylo pro další testování zachováno 1000 s nejlepší hodnotou *maximum likelihood*. V těchto 1000 stromech odpovídalo 377 zvolenému *constraint*, přičemž nejlepší z nich odpovídal topologii, kterou vygeneroval PAUP* jako nejlepší v samostatné analýze s definovaným *constraint*. V programu PAUP* byly následně vypočítány *site likelihoods* všech 1000 stromů. Vlastní AU test proběhl v programu CONSEL (Shimodaira & Hasegawa 2001).

3.5.6. Identifikace a rekonstrukce helixu 17-1 v SSU rRNA

Rekonstrukce 17-1 helixu byla prováděna na základě publikovaných sekundárních struktur SSU rRNA eukaryot, které byly staženy z European RNA database (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/>; Wuyts *et al.* 2004). Dnes již tato databáze není funkční, byla nahrazena databází silva (<http://www.arb-silva.de/>). K tomuto alignmentu byly následně ručně přidány sekvence SSU rRNA heteroloboseí a byly identifikovány konzervativní regiony 16, 17 a 18. Jelikož byla dosud publikována sekundární struktura 17-1 helixu z několika heteroloboseí (Nikolaev *et al.* 2004; Park *et al.* 2007), bylo možné určit přesnou pozici 17-1 helixu i u ostatních heteroloboseí včetně nově získaných sekvencí. Z identifikovaných sekvencí 17-1 oblastí byla pomocí algoritmu a serveru mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>; Zuker 2003) predikována sekundární struktura. Ta byla vizualizována v programu VARNA 3.6. Konečná grafická úprava proběhla v CorelDraw Graphics Suite X3.

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolovaná a kultivovaná anaerobní/mikroaerofilní *Heterolobosea*

Vzorky sladkovodních, mořských a brakických sedimentů byly odebrány z lokalit po celém světě, nejčastěji však v České republice. Vzorky získali z velké části kolegové z Přírodovědecké fakulty UK v Praze během svých expedic. Odebrané vzorky, které byly čerstvě inokulovány do živného média, byly pravidelně pozorovány pod mikroskopem a podmínky jejich kultivace byly optimalizovány. Stabilizace kultur trvala v některých případech i několik měsíců. Ve většině izolátů se kromě heteroloboseí vyskytovaly také jiné eukaryotické organismy, často ve vyšších populačních hustotách (především Ciliophora, Fornicata, Euglenozoa, Jakobida, Cercozoa, Archamoebae apod.).

Během stabilizace kultur byla optimalizována zejména doba pasážování a typ používaného živného média. V případě kultury EVROS2N se díky kultivaci na směsi média ATCC 1525 a 3% SWLB v poměru 1:9 výrazně zvýšilo relativní zastoupení heteroloboseí a snížila se i celková diverzita prvoků v kultuře. V jiných případech se takto dokonce podařilo získat monoeukaryotickou kulturu. Úspěšně byl tímto způsobem do monoeukaryotické kultury převeden izolát *Percolomonas* sp. INDSIP (z ATCC 802 do 3% LB média) a izolát PC4BIC (z ATCC 1525 přes směs ATCC 1525 a mořského 3% LB média do čistého 3% SWLB média).

Monoeukaryotickou kulturu PC4AM získal RNDr. Ivan Čepička, Ph.D. díky extrémnímu prodloužení cyklů pasážování (na několik týdnů). Ostatní druhy prvoků přítomné v této kultuře se s takto nastavenými intervaly pasážování nedokázaly vyrovnat.

Soupis všech izolátů anaerobních/mikroaerofilních heteroloboseí, které byly získány během řešení tohoto projektu, včetně místa jejich odběru a jejich taxonomického zařazení, je uveden v **tab. 12**.

Tab. 12: Izoláty anaerobních/mikroaerofilních heteroloboseí zkoumané v této studii.

Druh	Izolát	Lokalita	Souřadnice
<i>Percolomonas descissus</i>	AMT	Tambopata NP, Peru (S)	12°49'S, 69°16'W
	BAUM*	Fayetteville, Arkansas, USA (S)	36°02'N, 94°10'W
	JEFF*	Arkansas, USA (S)	nespecifikováno
	IND2	Bhangarh, Indie (S)	27°05'N, 76°17'E
	KG3N	údolí u Engilchek, Kirgizstán (S)	41°57'N, 79°18'E
	KOMPKOJ	Kojčice, ČR (kompost)	49°28'N, 15°15'E
	PANT1S	Pantanal NP, Brazílie (S)	16°37'S, 56°44'W
	SOOS1	Soos NP, ČR (S)	50°08'N, 12°24'E
	TEXEL	ostrov Texel, Nizozemí (S)	53°01'N, 04°44'E
	TOCOV	bývalá vesnice Tocov, ČR (S)	50°18'N, 13°05'E
	VT1B	rybník Velký Tisý, ČR (S)	49°03'N, 14°43'E
	VIDSEDAN	Kamenice, ČR (S)	49°54'N, 14°35'E
	SUSBARB	Sarawak, Borneo, Malajsie (S)	1°41'N, 110°26'E
<i>Percolomonas</i> sp. 1	CIZOV1	Čížov, ČR (S)	48°52'N, 15°52'E
	IND8	Bhangarh, Indie (S)	27°05'N, 76°17'E
	INDSIP ¹	přehrada Boroda, Indie (S)	27°02'N, 76°15'E
	OLB4	jezero Olbasee, Německo (S)	51°16'N, 14°35'E
	TUN2	Chomutov, ČR (S)	50°27'N, 13°21'E
	VITSED	Kamenice, ČR (S)	49°54'N, 14°35'E
<i>Monopylocystis visvesvarai</i>	PC4BIC ¹	Peggy's Cove, Kanada (M)	44°29'N, 63°55'W
<i>Psalteriomonas lanterna</i>	CIZOV2	Čížov, ČR (S)	48°52'N, 15°52'E
	VIT3	Kamenice, ČR (S)	49°54'N, 14°35'E
	VIT5	Kamenice, ČR (S)	49°54'N, 14°35'E
	VIT9	Kamenice, ČR (S)	49°54'N, 14°35'E
	VT2	rybník Velký Tisý, ČR (S)	49°03'N, 14°43'E
<i>Psalteriomonas</i> sp. 1	CERETE	Cereté, Kolumbie (S)	08°53'N, 75°47'W
	IND7	Bhangarh, Indie (S)	27°05'N, 76°17'E
	KIZILLAR	Kizillar, Turecko (S)	37°31'N, 35°42'E
<i>Sawyeria marylandensis</i>	ITZAVL	Itálie (S)	nespecifikováno
	LUH2	údolní niva Vltavy, ČR (S)	48°48'N, 13°57'E
	LUH3	údolní niva Vltavy, ČR (S)	48°48'N, 13°57'E
EVROS2N, gen. sp.	EVROS2N	delta řeky Evros, Řecko (B)	40°48'N, 26°01'E
	NY0199**	Bamfield, Kanada (M)	48°82'N, 125°12'W
Organismus PC4AM	PC4AM ¹	Peggy's Cove, Kanada (M)	44°29'N, 63°55'W

Vysvětlivky: (*) kulturu získal a pěstuje Dr. J. D. Silberman; (**) kulturu získal a pěstuje Dr. N. Yubuki; (¹) monoekaryotická kultura. (B) – brakický sediment; (M) – mořský sediment; (S) – sladkovodní sediment.

V současnosti jsou všechny výše uvedené sladkovodní izoláty pěstovány na modifikovaném Sonnenbornově médiu. Izolát *Percolomonas* sp. INDSIP je kromě toho dlouhodobě pěstován na 3% LB médiu. Pokusně byly převedeny na toto médium i některé izoláty druhu *Psalteriomonas* sp. 1, *Sawyeria marylandensis* a *Percolomonas descissus*. Dlouhodobě na něm ale nedokázaly prosperovat. Mořský Izolát PC4BIC je v současnosti pěstován na 3% SWLB médiu, mořský izolát PC4AM na ATCC 1525 médiu a brakický izolát EVROS2N na směsi 3% SWLB média a ATCC 1525 v poměru 9:1.

4.2. Sekvenace vybraných genů

Jednotlivé geny byly amplifikovány z genomové DNA pomocí specifických primerů. Celkem byly sekvenovány tři různé geny (gen pro SSU rRNA, gen pro α -tubulin a gen pro β -tubulin). U všech 34 izolátů byl sekvenován gen pro SSU rRNA. Gen pro SSU rRNA organismu PC4AM obsahuje jeden intron a má velmi aberantní sekvenci. Pro zjištění fylogenetické pozice organismu PC4AM byl u třech izolátů ještě sekvenován gen pro α -tubulin (izoláty PC4AM, TEXEL a EVROS2N) a u jednoho (PC4AM) gen pro β -tubulin. Během řešení projektu byla připravena ještě dvojice primerů specifických pro SSU rDNA hlavní anaerobní linie heteroloboseí (*Psalteriomonadidae*). Díky tomu nebylo nutné připravovat monoeukaryotické kultury. Všechny sekvence byly získány autorem práce, jediné tři výjimky tvoří sekvence SSU rDNA z kultur JEFF, BAUM a NY0199 (poskytnuty Dr. N. Yubukim z University of British Columbia a Dr. J. D. Silbermanem z University of Arkansas).

4.3. Fylogenetické analýzy a AU TEST

Na **obr. 4** je výsledek fylogenetické analýzy, která řeší otázku příbuznosti všech nově získaných sekvencí anaerobních heteroloboseí s výjimkou morfologicky unikátního izolátu PC4AM, a to na datasetu 1 (44 OTU a 1357 homologických pozic ve finální matici).

Na **obr. 5** je dataset rozšířen o ostatní linie heteroloboseí a o zástupce některých dalších linií skupiny Discoba (dataset 3; 83 OTU a 1246 homologických pozic ve finální matici). Skupiny Heterolobosea, Euglenozoa a Jakobida vyšly z této analýzy s vysokou statistickou podporou jako monofyletické. Vnitřní členění heteroloboseí je přitom u obou provedených analýz v souladu s těmi již publikovanými (např. Park *et al.* 2009; Brown *et al.* 2010).

Všechny nově získané sekvence anaerobních heteroloboseí (s výjimkou PC4AM) spadají s velmi vysokou statistickou podporou (hodnota bootstrapové podpory je 100 ve všech analýzách SSUrDNA) do již dříve objevené anaerobní linie heteroloboseí reprezentované rody *Monopylocystis*, *Sawyeria* a *Psalteriomonas* (v obrázcích je tato linie označena jako *Psalteriomonadidae*).

Linie EVROS2N a NY0199 je novou samostatnou linií skupiny *Psalteriomonadidae*. V analýze na **obr. 5** má tato linie dokonce v rámci této skupiny bazální postavení (bootstrapová

podpora je < 50). Naopak sekvence pocházející z izolátu PC4BIC (striktní bičíkovec) je téměř identická se sekvencí améby *Monopylocystis visvesvarai*.

Sekvence ostatních striktních bičíkovců studovaných během této studie tvoří monofyletickou skupinu sesterskou seskupení *Monopylocystis* – ‘*Pseudomastigamoeba*’. Tato skupina bičíkovců se dále rozpadá na dvě vysoce podpořené linie označené jako *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1.

Sekvence nově izolovaných heterolobosních améb spadají do blízké příbuznosti druhu *Sawyeria marylandensis* či *Psalteriomonas lanterna*. Sekvence izolátů CERETE, IND7 a KIZILLAR reprezentují samostatnou linii sesterskou druhu *Psalteriomonas lanterna* (pracovní název *Psalteriomonas* sp. 1).

Statistická podpora základního členění hlavní anaerobní linie heteroloboseí (*Psalteriomonadidae*) napříč provedenými analýzami:

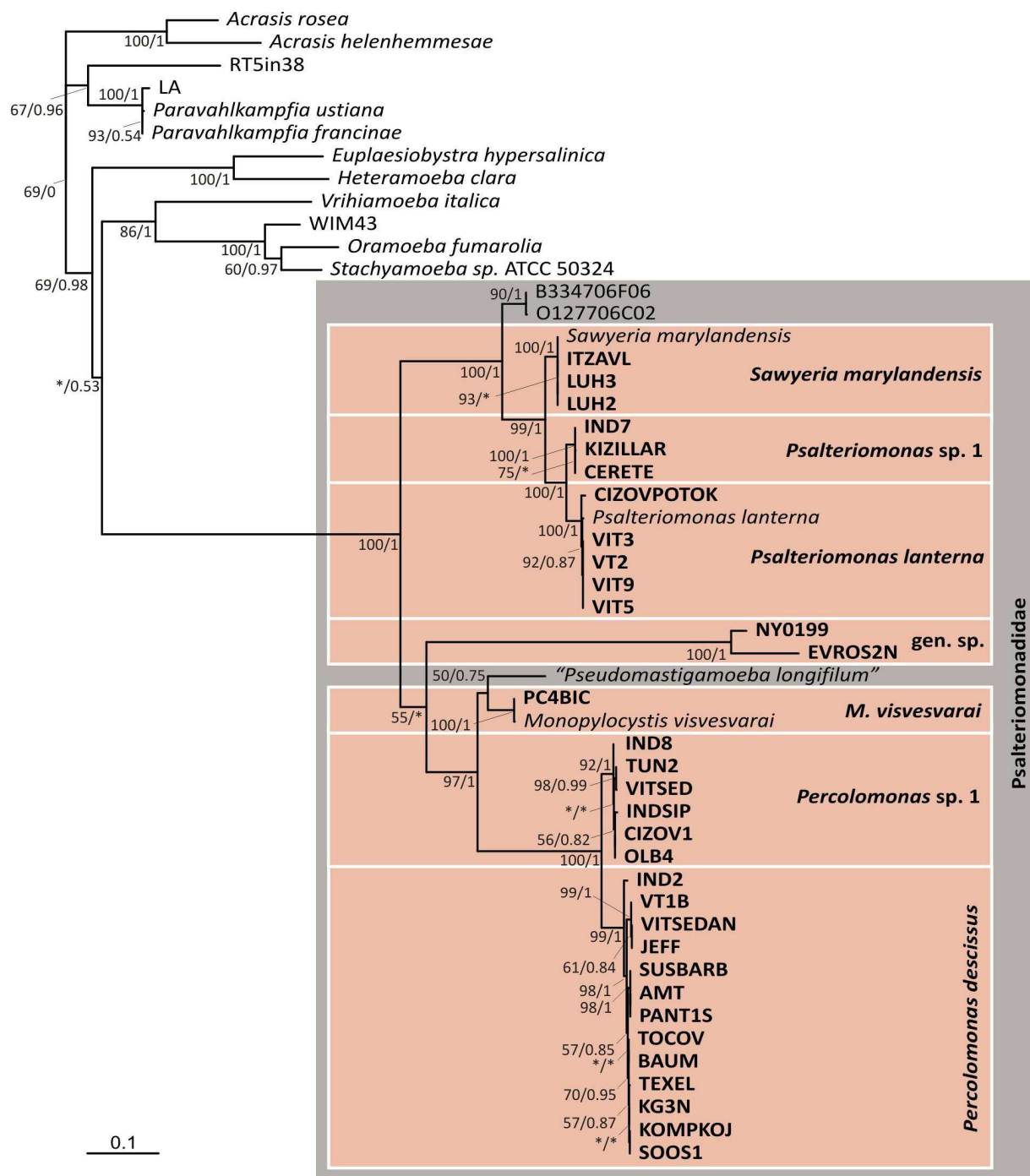
1. Skupina *Psalteriomonadidae* jako celek: 100 (velmi vysoká podpora).
2. Linie *Psalteriomonas* – *Sawyeria* – environmentální sekvence z extrémně acidofilního prostředí O127706C02 a B334706F06: 100 (velmi vysoká podpora).
3. Linie *Percolomonas pro parte* – ‘*Pseudomastigamoeba*’ – *Monopylocystis*: 98, resp 97 (velmi vysoká podpora).
4. Linie EVROS2N – NY0199: 100 (velmi vysoká podpora).

(všechny uvedené linie mají v analýzách zároveň Bayesovu posteriorní pravděpodobnost 1)

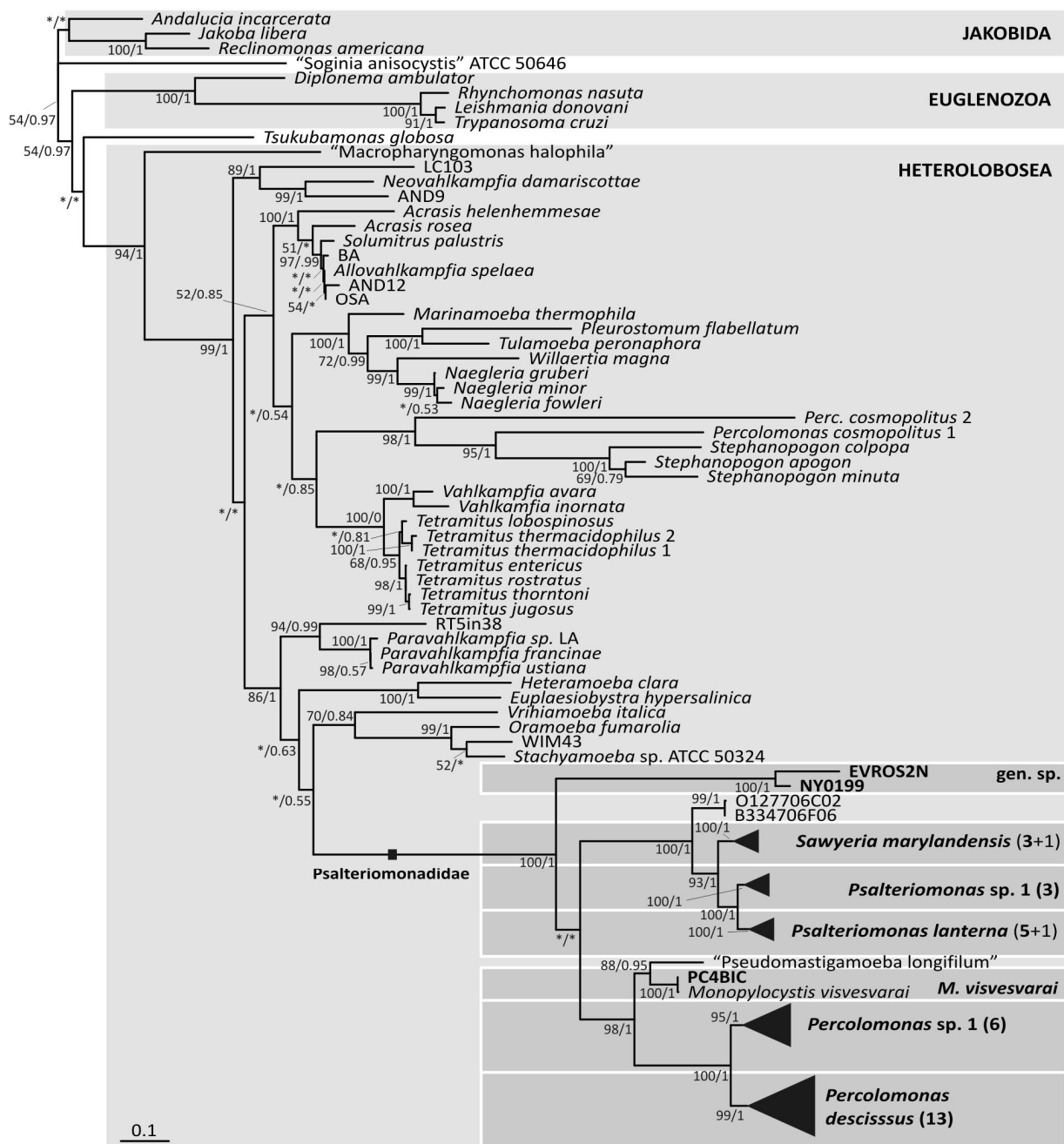
Statistická podpora monofylie jednotlivých druhů v rámci *Psalteriomonadidae*:

1. *Monopylocystis visvesvarai*: 100, resp 99 (velmi vysoká podpora).
2. *Percolomonas descissus*: 99 (velmi vysoká podpora).
3. *Percolomonas* sp. 1: 92, resp 95 (vysoká podpora).
4. *Psalteriomonas lanterna*: 100 (velmi vysoká podpora).
5. *Psalteriomonas* sp.: 100 (velmi vysoká podpora).
6. *Sawyeria marylandensis*: 100 (velmi vysoká podpora).
7. EVROS2N-NY0199 sp.: 100 (velmi vysoká podpora).

(všechny uvedené linie mají v analýzách zároveň Bayesovu posteriorní pravděpodobnost 1)



Obr. 4: Fylogenetická analýza SSU rDNA nově získaných izolátů anaerobních heteroloboseí (s výjimkou izolátu PC4AM), malý dataset. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapové podpory/Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti. Hodnoty < 50/0.50 jsou označeny hvězdičkou (*). Topologie fylogramu odpovídá základní topologii získané s použitím metody maximální věrohodnosti (ML) pomocí substitučního modelu GTRGAMMAI (program RAXML 7.2.6.). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Bayesian phylogenetic inference metoda proběhla v programu MrBayes 3.1.2 s použitím modelu GTR + Γ + I + covarion (1 500 000 generací). Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Strom není zakořeněn.



Obr. 5: Fylogenetická analýza SSU rDNA nově získaných izolátů anaerobních heteroloboseí (s výjimkou izolátu PC4AM). Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapové podpory/Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti, hodnoty < 50/0.50 jsou označeny hvězdičkou (*). Topologie fylogramu odpovídá základní topologii získané s použitím metody maximum likelihood pomocí substitučního modelu GTRGAMMAI (program RAXML 7.2.6.). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Bayesian phylogenetic inference metoda proběhla v programu MrBayes 3.1.2. s použitím modelu GTR + Γ + I + covarion (4 000 000 generací). Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence, resp. taxony, jimž tyto sekvence patří. V závorkách jsou uvedeny počty sekvencí, které byly kolabovány do trojúhelníků. Tučně je označen počet sekvencí, které byly nově získány během této studie. Černý čtverec označuje hlavní anaerobní linii heteroloboseí (zde pod názvem Psalteriomonadidae). Strom není zakořeněn.

Obr. 6 a **7** reprezentují výsledky fylogenetických analýz řešících možnou fylogenetickou pozici izolátu PC4AM vzhledem k ostatním nově získaným sekvencím anaerobních heteroloboseí, ostatním heteroloboseím i hlavním skupinám eukaryot.

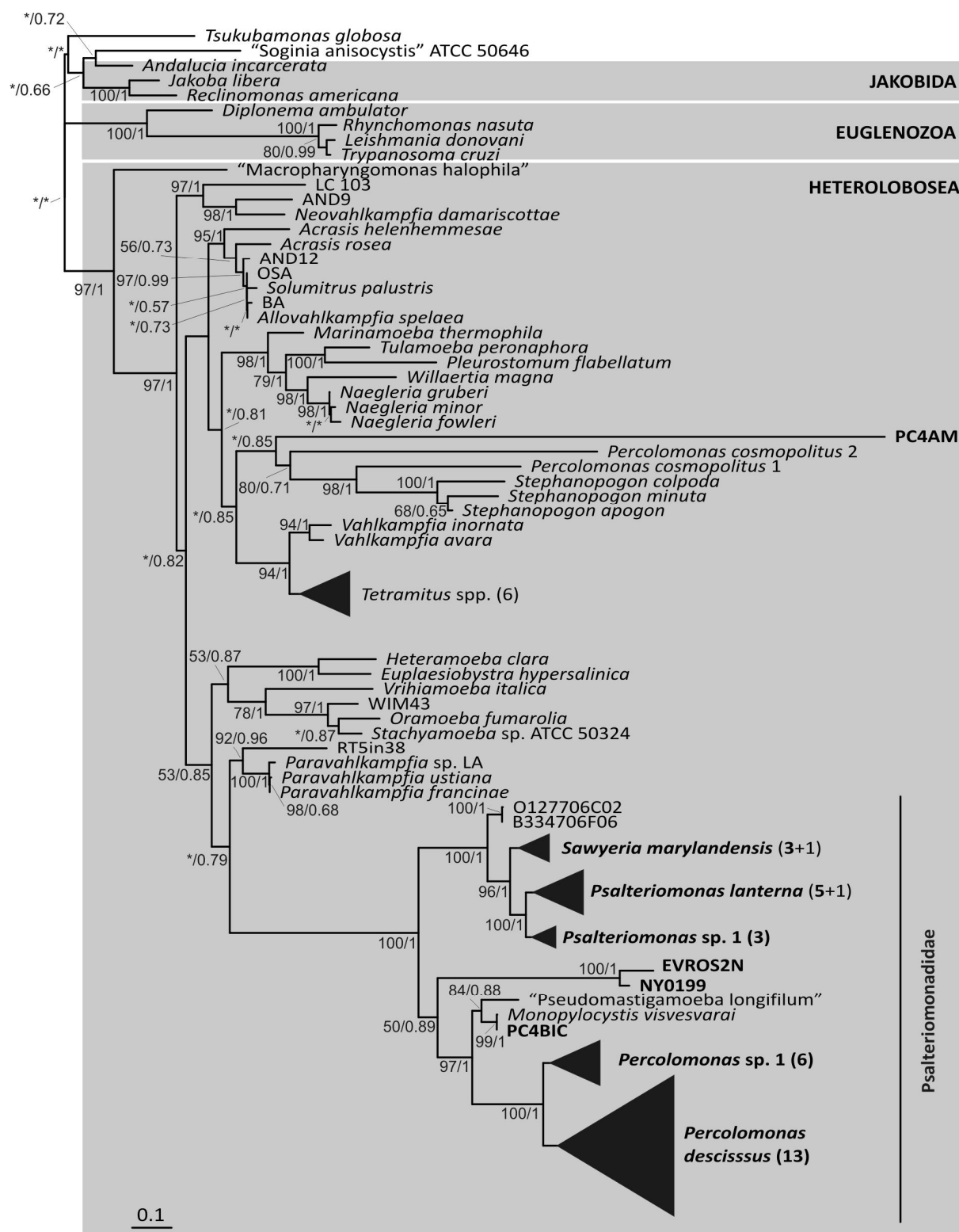
V případě sekvence SSU rDNA získané z monoeukaryotické kultury PC4AM byla provedena řada samostatných analýz (globálně-eukaryotických), které ukazovaly na její vysokou aberanci (v práci tyto analýzy nejsou z prostorových důvodů uvedeny). Později byl do analýzy zahrnut i rod *Stephanopogon* (Heterolobosea) a sekvence PC4AM jej přitahovala k sobě. Z toho důvodu byla sekvence SSU rDNA z izolátu PC4AM přidána do datasetu předchozí analýzy a byla znovu vytvořena finální matice zahrnující tentokrát 84 OTU a 1211 pozic (dataset 2). Výsledek této analýzy je na **obr. 6**. Základní topologie byla v tomto případě konstruována dvěma způsoby: (1) v programu PAUP* s použitím modelu TrN + I + Γ (byl vybrán na základě provedení *Hierarchical likelihood ratio test*); (2) v programu RAXML s použitím modelu GTRGAMMAI. Topologie obou stromů byla stejná, lišila se jen v délce větví. Na **obr. 6** je jako základní topologie použit výsledek analýzy v programu RAXML, kde byla pod stejným modelem provedena i bootstrapová analýza.

Přestože se sekvence PC4AM nachází uvnitř heteroloboseí, zachovává se vysoká míra statistické podpory monofylie této skupiny (bootstrapová podpora 97, Bayesova posteriorní pravděpodobnost 1). PC4AM konkrétně vychází jako sesterská linie seskupení *Percolomonas cosmopolitus* – *Stephanopogon* spp. Bootstrapová podpora této konkrétní fylogenetické pozice je však statisticky neprůkazná (<50). Je vidět, že se oproti původní analýze mění i pozice některých jiných taxonů (linie *Paravahlkampfia* spp. – RT5in38, *Tsukubamonas globosa*, 'Soginia anisocystis', linie EVROS2N – NY0199). Postavení těchto linií však mělo nízkou statistickou podporu i v předchozí analýze (**obr. 5**).

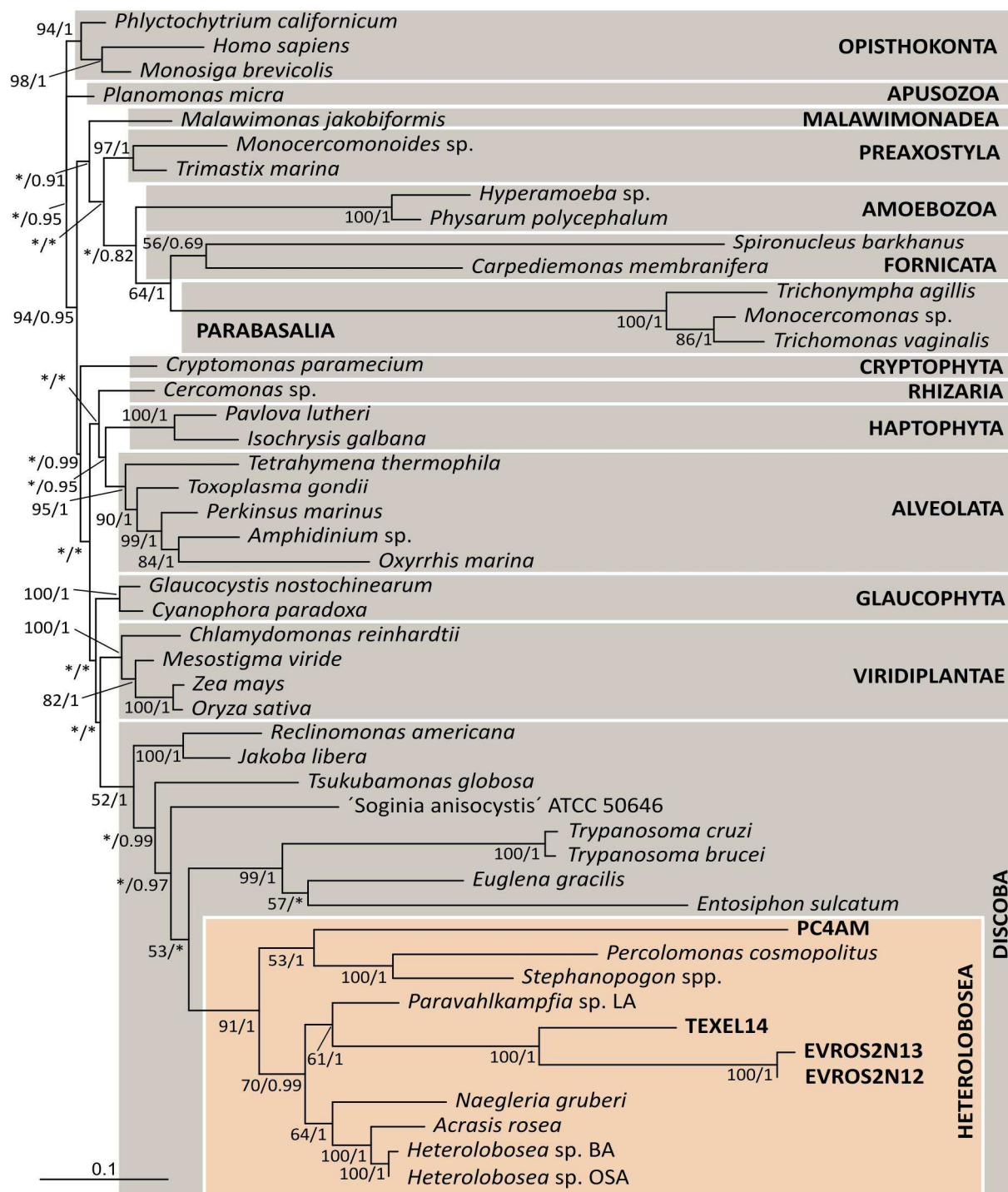
Ve snaze zpřesnit fylogenetickou pozici PC4AM v rámci heteroloboseí byly analyzovány i geny pro α - a β -tubulin. Gen pro α -tubulin byl sekvenován též z izolátů TEXEL a EVROS2N (zástupci hlavní anaerobní linie heteroloboseí). Geny byly analyzovány jak samostatně – datasety 5 a 6 (v práci z prostorových důvodů nejsou tyto analýzy uvedeny), tak v konkatenátu s genem pro SSU rRNA (dataset 7; viz **obr. 7**). Do konkatenátu byly zahrnuty všechny druhy a izoláty heteroloboseí, u kterých jsou známy sekvence alespoň dvou z těchto tří genů (neznámé pozice byly nahrazeny neurčitými aminokyselinami). Neurčitými aminokyselinami byly nahrazeny i sekvence genu pro α -tubulin ze zástupců skupin

Opisthokonta, Apusozoa, Diplomonadida a Parabasalia, protože mají jiný paralog tohoto genu než ostatní eukaryota (Simpson *et al.* 2008). Výsledkem konkatenace je zvýšení statistické podpory linie PC4AM – *Percolomonas cosmopolitus* – *Stephanopogon* spp. (bootstrap vzrostl z hodnoty 13 na 53 a Bayesova posteriorní pravděpodobnost z 0.85 na 1).

Aby byla vyloučena možnost, že PC4AM tvoří monofylum se skupinou Psalteriomonadidae, byl ještě proveden AU test (na datasetu 2 - SSUrDNA). 377 topologií z 1000 nejlepších topologií vytvořilo monofyletickou skupinu PC4AM-Psalteriomonadidae. AU test provedený se stromy sestavenými z datasetu 2 (SSU rDNA) na zvolené hladině $p=0,05$ nezamítl hypotézu H_0 (viz **kap. 3.5.5.**). Nelze proto vyloučit, že PC4AM tvoří se skupinou Psalteriomonadidae monofyletickou skupinu. V budoucnu bude nutné provést AU test ještě u datasetu 7 (třígenový konkatenát).



Obr. 6: Fylogenetická analýza SSU rDNA nově získaných izolátů anaerobních heteroloboseí včetně izolátu **PC4AM**. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapové podpory/Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti, hodnoty < 50/0.50 jsou označeny hvězdičkou (*). Topologie fylogramu odpovídá základní topologii získané s použitím metody maximální věrohodnosti (ML) pomocí substitučního modelu GTRGAMMAI (RAxML 7.2.6.). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. *Bayesian phylogenetic inference* metoda proběhla v programu MrBayes 3.1.2. s použitím modelu GTR + Γ + I + covarion (4 000 000 generací). Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence, resp. taxony, jimž tyto sekvence patří. V závorkách jsou uvedeny počty sekvencí, které byly kolabovány do trojúhelníků (tučně počet nově získaných sekvencí).



Obr. 7: Výsledek fylogenetické analýzy založené na konkatenci genů pro SSU rRNA, alfa-tubulin a beta-tubulin. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapové podpory/Bayesovské posteriorní pravděpodobnosti, hodnoty < 50/0.50 jsou označeny hvězdičkou (*). Topologie fylogramu odpovídá základní topologii získané s použitím metody maximální věrohodnosti (ML) pomocí substitučního modelu GTRGAMMAIF, respektive PROTGAMMAILGF (program RAxML 7.2.6.). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. *Bayesian phylogenetic inference* metoda proběhla v programu MrBayes 3.1.2. s použitím modelů GTR + Γ + I + covarion a WAG + Γ + I + covarion (9 000 000 generací). Tučně jsou zvýrazněny nově získané sekvence. Strom není zakořeněn.

4.4. Hledání regionu 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA

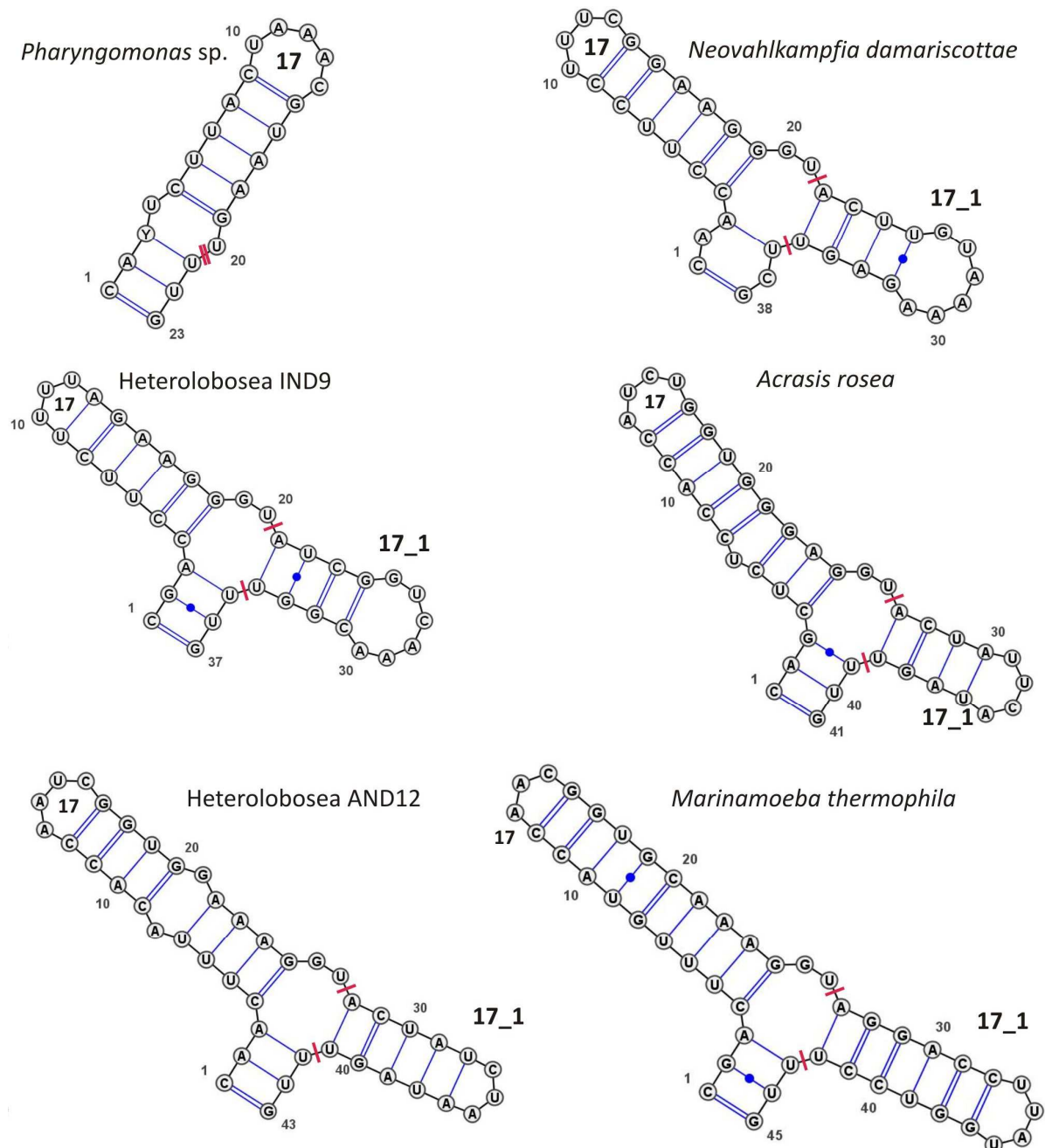
K ověření hypotézy, že organismus s pracovním názvem PC4AM patří do skupiny Heterolobosea byl v sekvenci jeho SSU rDNA hledán region 17-1. Protože však byla dosud publikována predikce sekundární struktury SSU rRNA v 17-1 regionu jen u několika málo druhů heteroloboseí (např. Nikolaev *et al.* 2004; Park *et al.* 2007), byla během tohoto projektu jeho podoba rekonstruována též u dalších zástupců heteroloboseí včetně těch nově objevených (viz **obr.8-I – 8-VI**).

Region 17-1 (17-1 helix) se u různých zástupců heteroloboseí liší. Bylo také ověřeno, že 17-1 helix chybí v sekundární struktuře SSU rRNA u 'Macropharyngomonas halophila', bazální linie heteroloboseí.

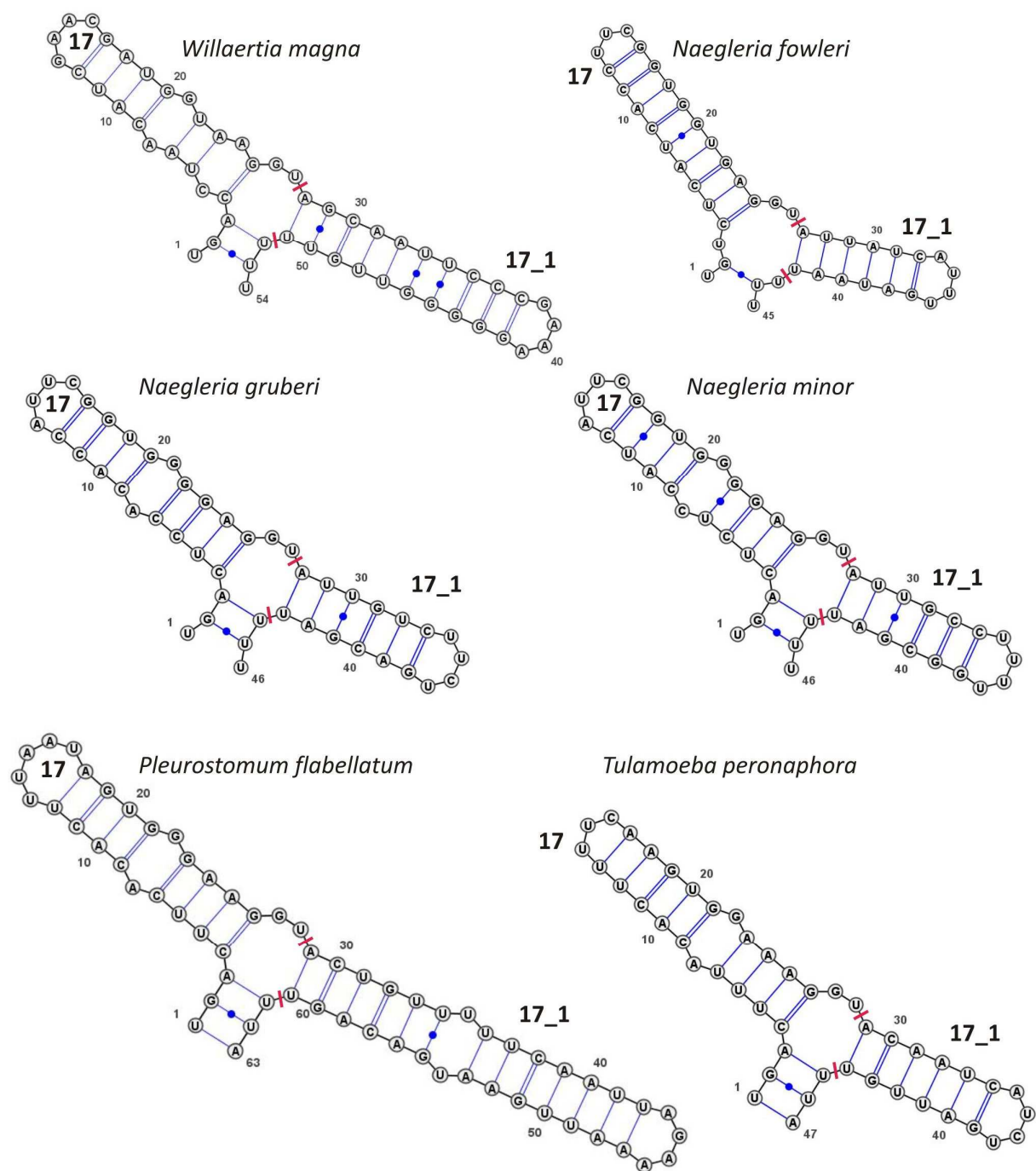
Organismus PC4AM má extrémně aberantní sekvenci SSU rRNA. Stejně tak má i netypickou sekvenci v oblasti helixu 17 a 18. Zdá se však, že určitý helix je v oblasti odpovídající poloze 17-1 regionu přítomný (viz **obr. 8-II**). Predikce jeho sekundární struktury však není jednoznačná (existuje více teoretických možností, jak by mohla sekundární struktura dané oblasti vypadat).

Helix 17-1 byl rekonstruován též u zástupců skupiny Psalteriomonadidae. Ukázalo se, že jeho podoba kopíruje vymezení druhů *Psalteriomonas lanterna*, *Psalteriomonas* sp. 1, *Sawyeria marylandensis* a *Monopylocystis visvesvarai*. Pro každý druh je vždy unikátní podoba jak sekvenční, tak strukturní.

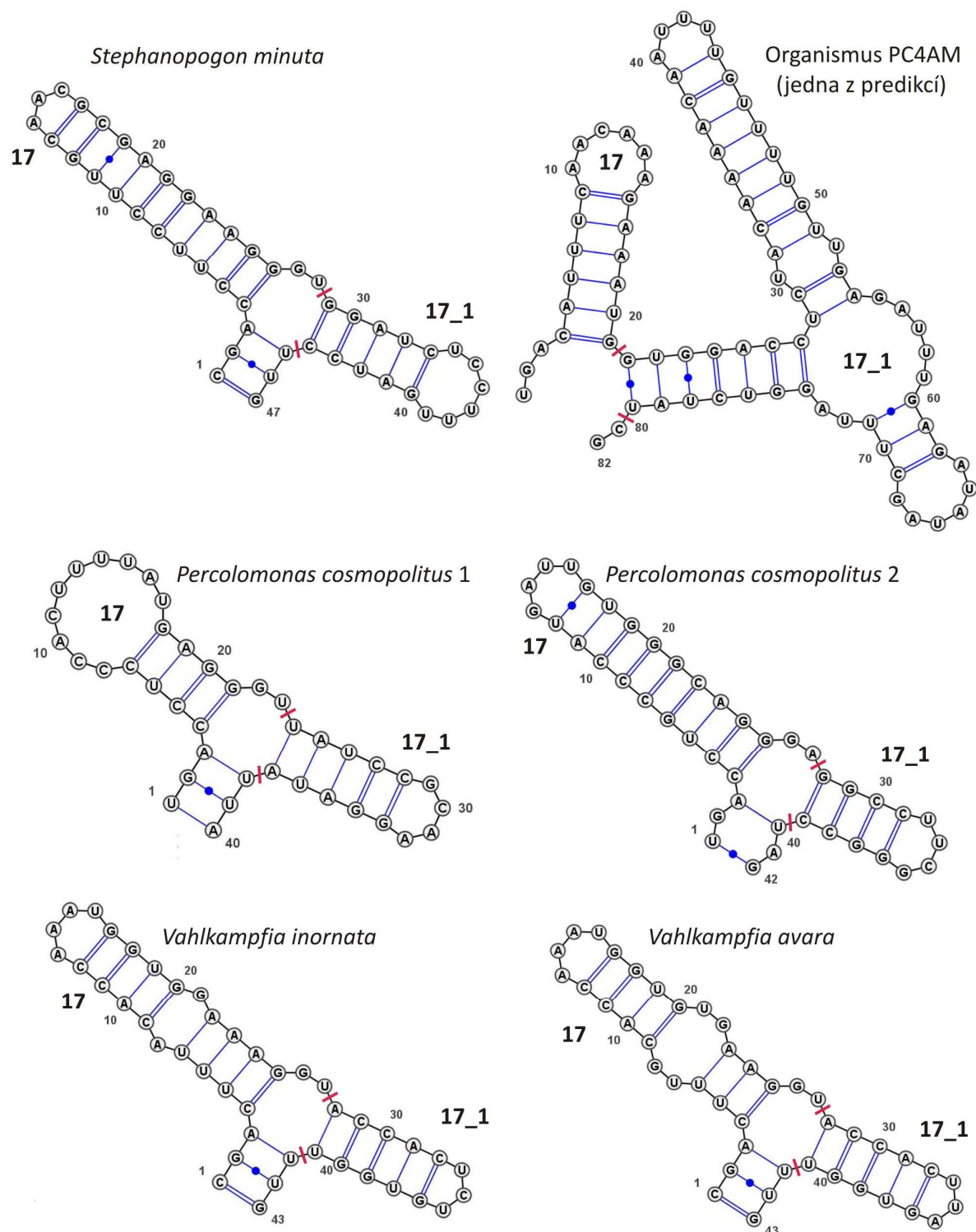
Druhy *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1 mají strukturu 17-1 helixu stejnou. Naopak sekvence tohoto helixu se mezi izoláty liší, ale nekopíruje stanovenou druhovou hranici. Stejnou sekvenci má helix 17-1 u části izolátů z obou druhů (izoláty INDSIP, IND8, TUN2, VITSED z *Percolomonas* sp. 1 a TEXEL, TOCOV, KG3N, KOMPKOJ, SOOS1, BAUM z druhu *Percolomonas descissus*). Sekvenční odlišnost je však způsobena pouze substitucemi v oblasti smyčky.



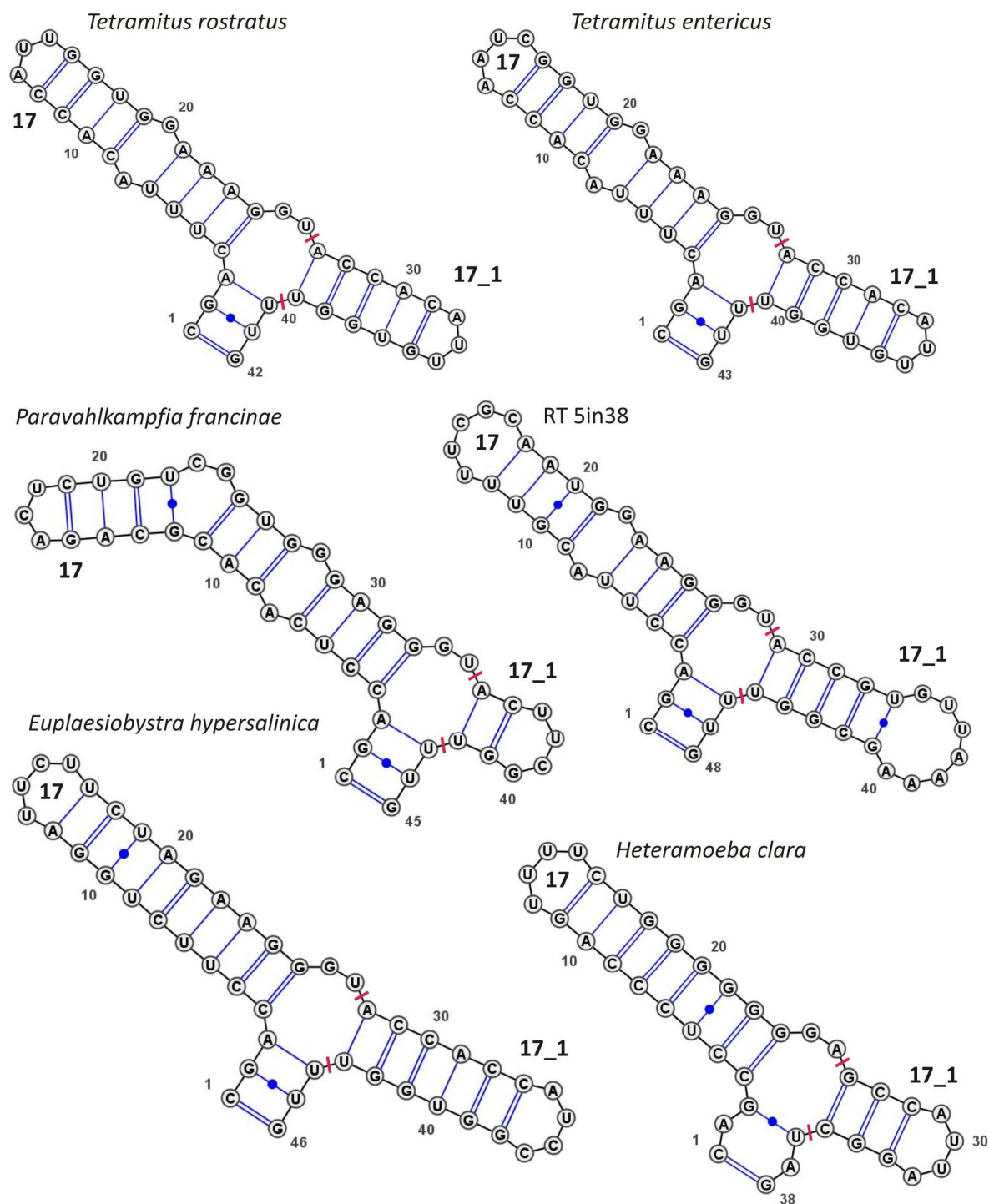
Obr. 8-I: Rekonstruovaný helix 17 a 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí. *Pharyngomonas* sp. ('Macropharyngomonas halophila') jako nejbazálnější linie heteroloboseí nemá helix 17-1 vytvořen. Červenými úsečkami je vymezen helix 17-1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.



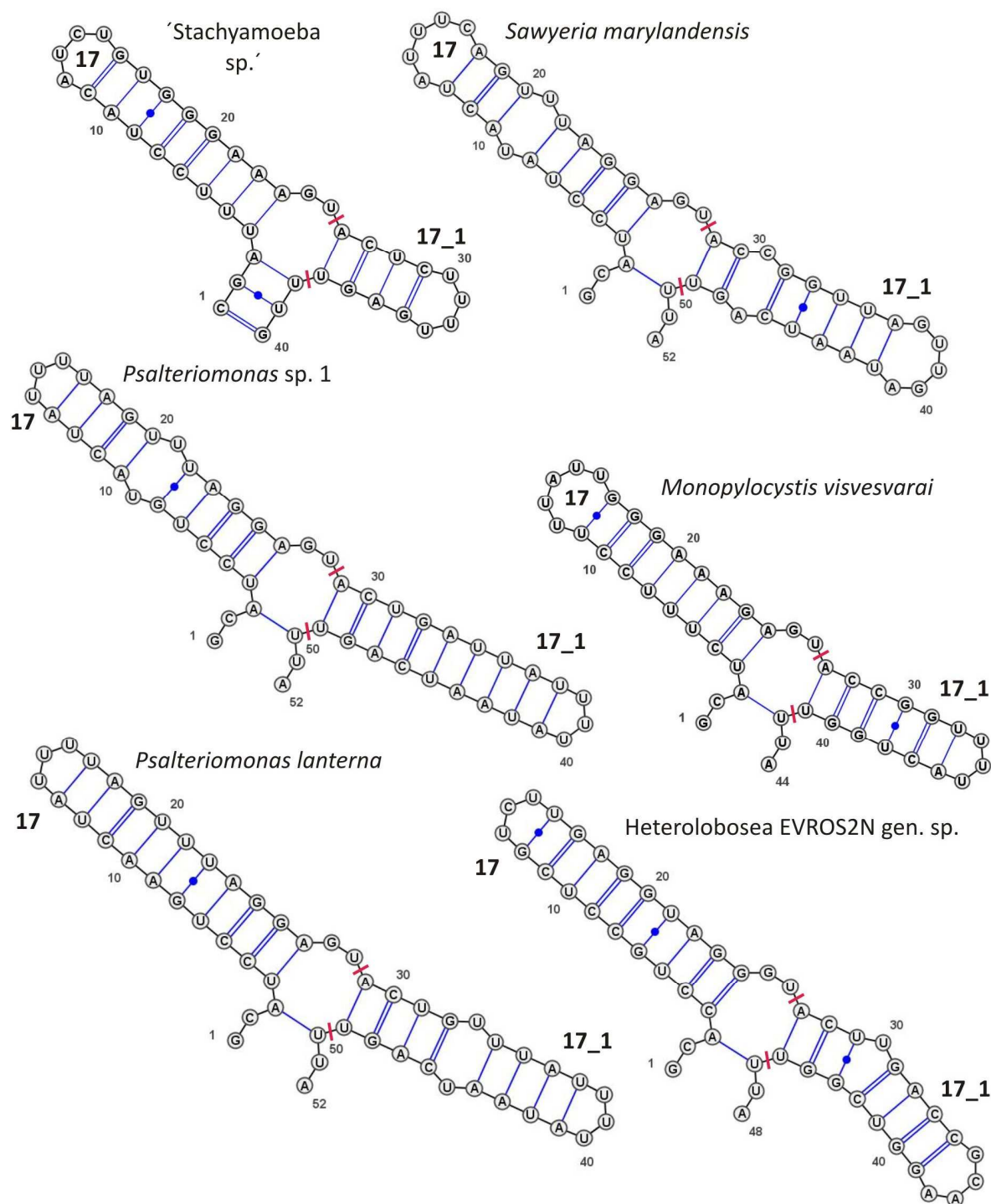
Obr. 8-II: Rekonstruovaný helix 17 a 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí. Červenými úsečkami je vymezen helix 17-1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.



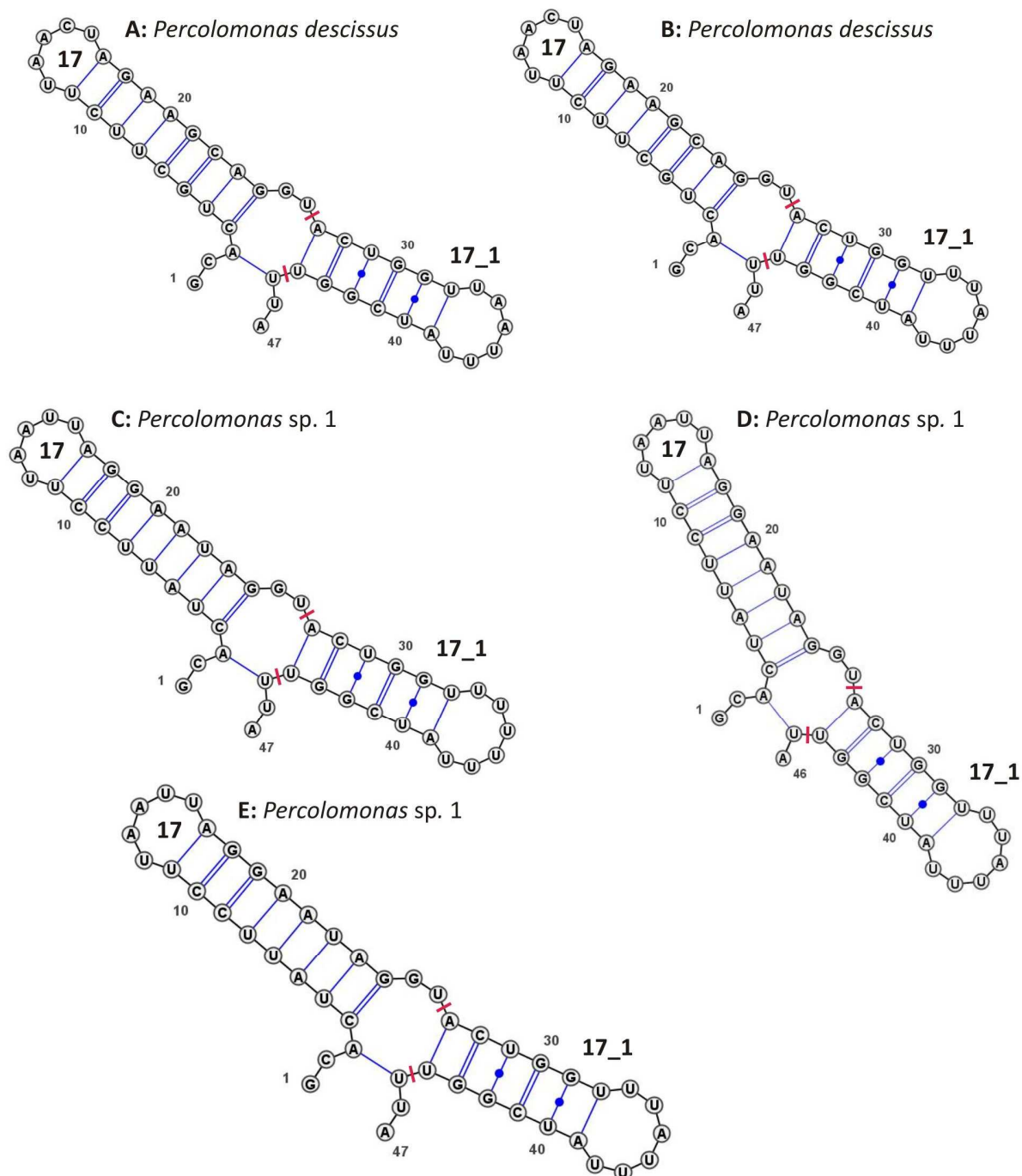
Obr. 8-III: Rekonstruovaný helix 17 a 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí. Organismus PC4AM má nejpodivnější helix 17-1 ze všech heteroloboseí (možno predikovat více variant, zde uvedena pouze jediná). Červenými úsečkami je vymezen helix 17-1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.



Obr. 8-IV: Rekonstruovaný helix 17 a 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí. *Paravahlkampfia francinae* má jen velmi krátký helix 17-1. Červenými úsečkami je vymezen helix 17-1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.



Obr. 8-V: Rekonstruovaný helix 17 a 17-1 v sekundární struktuře SSU rRNA u heteroloboseí. Všechny tři izoláty *Psalteriomonas* sp. 1 (CERETE, KIZILLAR i IND7) mají stejný 17-1 helix (sekvenci i strukturu). Stejně tak se helix 17-1 nijak neliší ani mezi jednotlivými sekvencemi druhu *Psalteriomonas lanterna* – VT2, VIT3, VIT5, VIT9, CIZOVPOKOTOK a publikovaná sekvence z GenBank (AF420005). Unikátní podobu 17-1 helixu sdílí také *Monopylocystis visvesvarai* PC4BIC a publikovaná sekvence *Monopylocystis visvesvarai* (uložena v GenBank pod označením AF011463). Unikátní a vzájemně stejný helix 17-1 mají i všechny izoláty přiřazované druhu *Sawyeria marylandensis*, včetně publikované sekvenec (v GenBank pod označením AF439351). Červenými úsečkami je vymezen helix 17-1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.



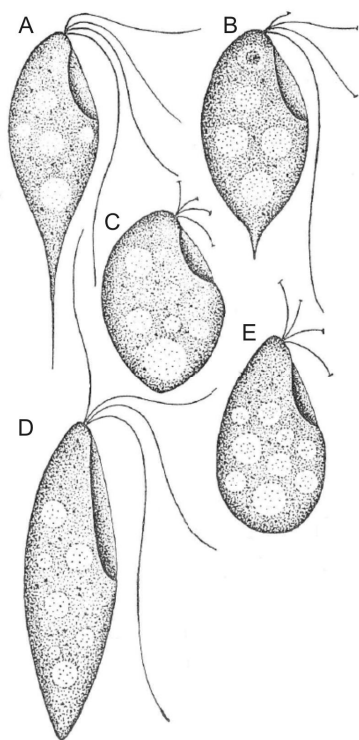
Obr. 8-VI: Rekonstruovaný helix 17 a 17_1 v sekundární struktuře SSU rRNA u izolátů *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1. A – *Percolomonas descissus* AMT, SUSBARB, PANT1S, VT1B, VITSEDAN, JEFF, a IND2; B – *Percolomonas descissus* TEXEL, TOCOV, KG3N, KOMPKOJ, SOOS1, BAUM. C – *Percolomonas* sp. 1. CIZOV1 a OLB4; D – *Percolomonas* sp. 1 VITSED (stejný jako u *P. descissus* B); E – *Percolomonas* sp. 1 INDSIP, IND8 a TUN2. Červenými úsečkami je vymezen helix 17_1. Číslováno ve směru od 5' do 3'.

4.5. Základní morfologická charakterizace

Percolomonas descissus

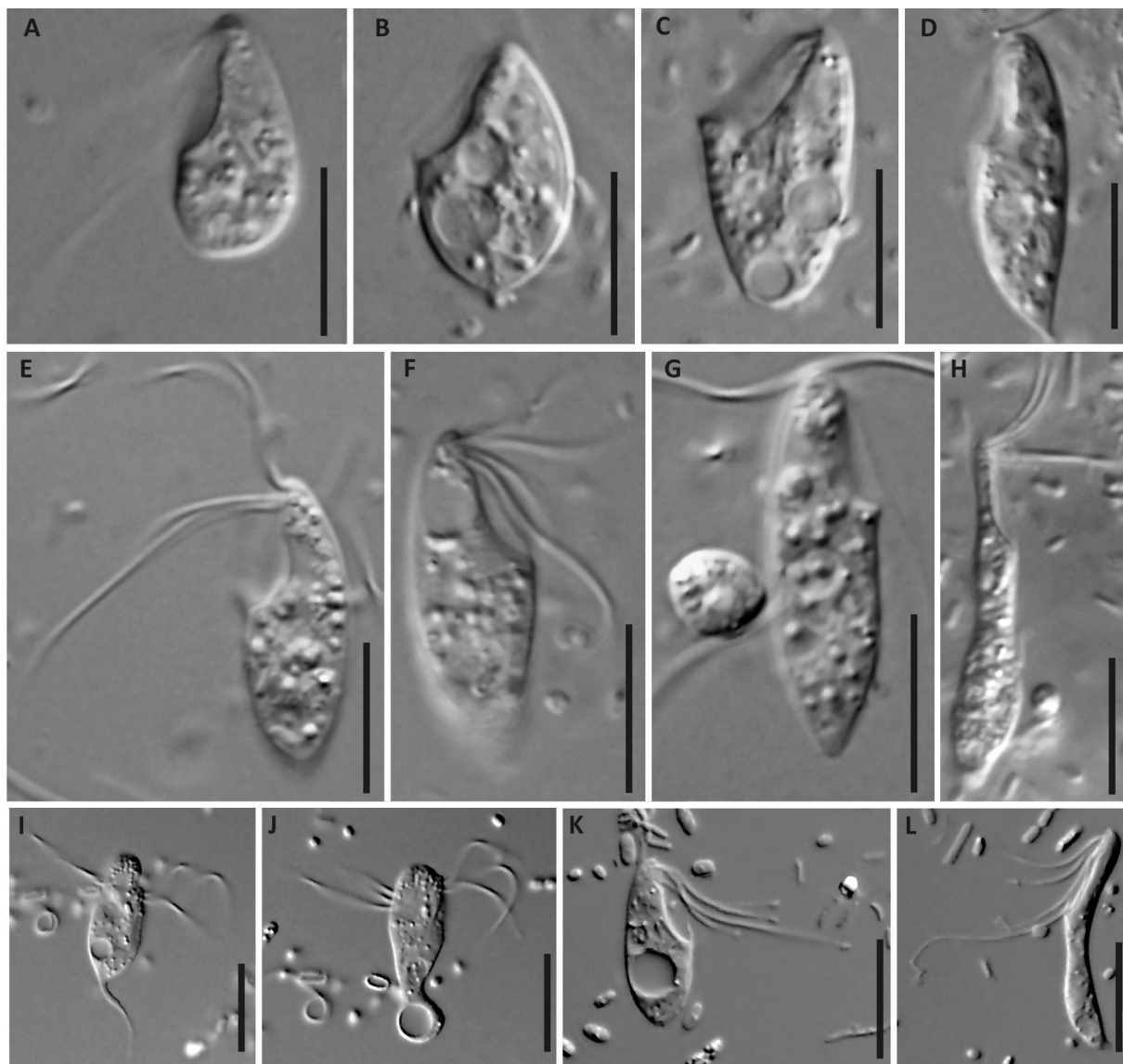
Sladkovodní bičíkovci. Morfologie jednotlivých kmenů *Percolomonas descissus* byla ve shodě s publikovanými daty (Klug 1936; Brugerolle and Simpson 2004). V monoeukaryotických kulturách tohoto druhu nikdy nebyly pozorovány améby ani cysty. Buňky bičíkovců byly vřetenovité, protáhlé, nebo i zavalité (viz **obr. 10**). Délka buněk byla měřena zaživa u čtyř izolátů tohoto druhu, vždy na 50 jedincích: PANT1S – $16,8 \pm 3,3$ (10,5 – 24,9) μm , SOOS1 – $17,8 \pm 3,8$ (10,2 – 25,0) μm , TEXEL – $18,2 \pm 3,6$ (12,7 – 29,7) μm a VT1 – $18,1 \pm 4,9$ (12,0 – 31,4) μm . Průměrná délka buňky druhu *Percolomonas descissus* byla tedy $17,0 \pm 4,0$ (10,2 – 31,4) μm .

Buňky byly i v rámci jedné pasáže monoeukaryotické kultury tvarově vysoce variabilní (viz **obr. 9**), přesto je možné rozlišit několik hlavních morfortypů (mezi nimi ale existují přechody): (a) podlouhlé vřetenovité buňky (**obr. 9D**); (b) vřetenovité buňky se zúženým, trnovitým zadním koncem (**obr. 9A, 9B, 15B**); (c) štíhlé, výrazně prodloužené buňky (**obr. 10H, 10L**); (d) hruškovité buňky se zaobleným koncem těla (**obr. 9E**); e) zavalité buňky se zúženým zadním koncem těla (**obr. 9C**). Buňky nesou čtyři bičíky, jejich relativní délka vůči tělu buňky je nestabilní, protože variabilita v délce buňky je u tohoto druhu a rodu vysoká. Nejdelší bičík je



Obr. 9: Hlavní morfortypy bičíkovce *Percolomonas descissus* pozorované Klugem (1936). A – vřetenovité buňky s charakteristickým dlouhým trnovitým výběžkem; B – vřetenovité buňky s krátkým trnovitým výběžkem; C – zavalitá forma se zúženým zadním koncem; D – podlouhlá vřetenovitá forma bez trnovitého výběžku; E – zavalitá hruškovitá forma. Upraveno podle Klug 1936.

obvykle delší než buňka (někdy jen nepatrně, jindy i více než 2x), jeden bičík je středně dlouhý (cca 3/5 délky nejdelšího bičíku) a dva bičíky jsou krátké (jen o trochu kratší než bičík střední délky). Při pohybu buňky rotují a pohybují se v malých obloučcích. Poměrně často je lze pozorovat též přisedlé na podkladu pomocí zadního konce těla. Přisedlé buňky synchronizovaným pohybem svých bičíků přihánjí potravu do potravní rýhy. Potravní rýha obvykle není delší než třetina délky buňky.

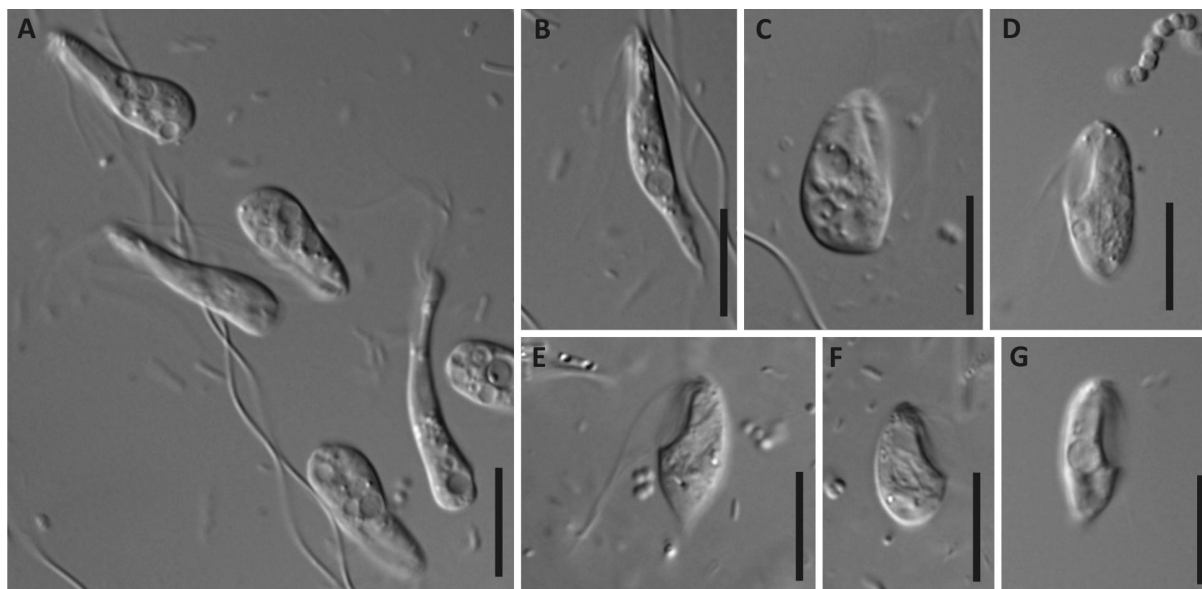


Obr. 10: *Percolomonas descissus*. A – G izolát TEXEL (A – C hruškovité buňky se zaobleným koncem těla; D – G vřetenovité buňky); H – izolát VT1B (dlouhá forma); I – L izolát PANT1 (I – J dělící se buňka se 6 bičíky a dvěma cytostomy; K – vřetenovitá forma; L – dlouhá forma). Nomarského diferenciální interferenční kontrast, živé buňky. Měřítka představují délku 10 μm .

***Percolomonas* sp. 1**

Sladkovodní bičíkovci řazení do tohoto nového (dosud nepopsaného) druhu byli pozorováni v kulturách IND8, IND SIP, CIZOV1, TUN2, VITSED. Buňky byly v naprosté většině detailů, včetně délky buněčného těla i bičíků, identické s *Percolomonas descissus* (viz **obr. 11**). Stádium améby ani cysty nebylo pozorováno. Délka buněk byla měřena zaživa vždy na 50 jedincích a to u dvou izolátů (oba pěstované na ATCC 802 médiu): IND8 – $18,0 \pm 3,6$ (13,0 – 34,2) μm a IND SIP – $16,3 \pm 3,2$ (10,8 – 25,2) μm . Průměrná délka buňky tohoto druhu tedy byla $17,1 \pm 3,5$ (10,8 – 34,2) μm .

Buňky byly opět vysoce tvarově variabilní, od druhu *Percolomonas descissus* se však odlišovaly tvarem zadní části buňky. Zatímco u druhu *Percolomonas descissus* může být trn poměrně dlouhý, u druhu *Percolomonas* sp. 1 je přítomen jen vzácně, a to velice krátký (chybí tedy forma zobrazená na **obr. 9A, 15B**). Při mikroskopickém pozorování kultury INDSIP byla opakovaně pozorována tendence shlukovat se kolem částic sedimentu.

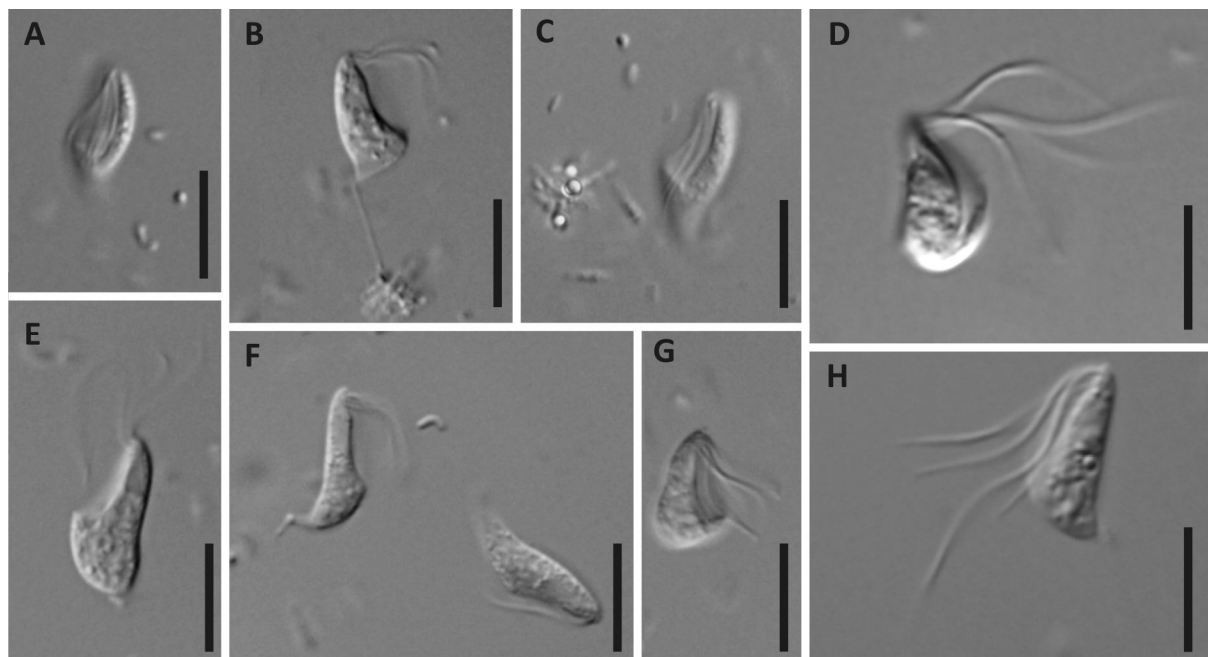


Obr. 11: *Percolomonas* sp. INDSIP. A – několik buněk různých tvarů; B – podlouhlá buňka při pohybu; C – zavalitá buňka s viditelným cytostomem; D – buňka s viditelným cytostomem; E – větvenovitá buňka s viditelným cytostomem; F – zavalitá buňka s viditelným cytostomem; G – větvenovitá forma s viditelným cytostomem. Nomarského diferenciální interferenční kontrast, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

Heterolobosea EVROS2N gen. sp.

Bičíkovci řazení do tohoto dosud nepopsaného rodu byly pozorovány v monoeukaryotických kulturách EVROS2N a NY0199. Měňavkovitá stádia a cysty nejsou známy. Morfologie bičíkovců byla podobná oběma předchozím druhům (*Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1), ovšem buňky byly menší (viz **obr. 12**). Bičíky byly v mastigontu vždy 4, jeden delší než buňka (cca 1,5x) a tři kratší (cca v délce buňky). Délka buněk byla měřena zaživa: EVROS2N – $13,7 \pm 3,5$ (8,5 – 21,3) μm (n=50, různé pasáže, směs 3% SWLB a ATCC 1525 média v poměru 9:1) a NY0199 – 14,0 (11,5 – 19,7) μm (n=30).

Hlavní rozdíl mezi tímto druhem a druhy *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1 spočívá v délce buňky a ventrální rýhy. Zatímco u *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1 ventrální rýha dosahovala obvykle 1/3 délky buňky, u tohoto rodu byla obvykle delší (1/2 až 2/3 délky buňky) a výraznější.

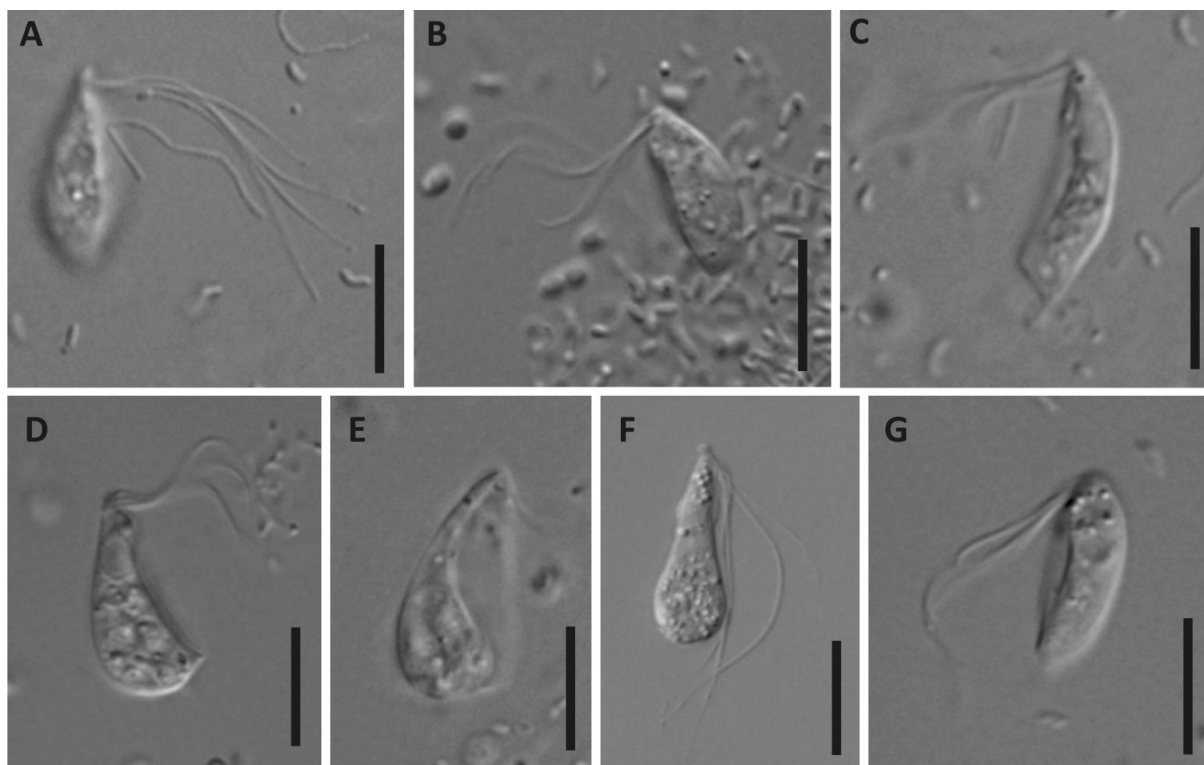


Obr. 12: Heterolobosea EVROS2N gen. sp. A – buňka s viditelnými čtyřmi bičíky a širokým cytostomem; B – buňka při lovu bakterií přisedlá cytoplasmatickým můstkem k substrátu; C – buňka s viditelným cytostomem; D – mrtvá buňka s viditelnými čtyřmi bičíky; E – buňka s dobře viditelným cytostomem; F – protáhlé buňky s viditelným cytostomem; G – zavalitá forma s viditelným cytostomem; H – buňka s viditelnou délkou všech čtyř bičíků. Nomarského diferenciatní interferenční kontrast, živé buňky (G – H mrtvé buňky). Měřítka představují 10 µm.

Bičíkaté stádium druhu *Monopylocystis visvesvarai*

V monoeukaryotické kultuře PC4BIC vyrůstali mořští bičíkovci, kteří během cca 250 pasáží kultivace nejevili (a stále nejeví) žádné známky transformace na měňavkovitá stádia či cysty. Pozorované buňky *M. visvesvarai* byly morfologicky uniformnější než buňky ostatních zde popsaných bičíkovců (viz **obr. 13**). Některé buňky měly na zadním konci těla špičku, jiné byly zaoblené. Variabilita byla pozorována také v délce těla, bičíků a velikosti jádra. Bičíky byly v mastigontu vždy 4, v typickém stavu byl jeden nejdelší (asi 1,2 - 1,5x delší než buňka), dva středně dlouhé a jeden krátký. Rozdíl mezi středně dlouhými bičíky a nejdelším bičíkem byl méně výrazný než v případě *P. descissus*. V některých případech měly tyto tři bičíky téměř stejnou délku.

Buňky izolátu PC4BIC byly měřeny v různých pasážích, a to na médiu ATCC 1525 (n=50). Délka jejich buňky byla $15,7 \pm 1,7$ (11,1 – 19,9) µm. Jejich tvar se zřetelně lišil jak od druhů *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1, tak od rodu reprezentovaného izolátem EVROS2N. Hlavní rozdíl byl parný na tvaru exkavátní rýhy, která nemá podobu prosté kotliny, ale je elipsoidní a dosahuje téměř až na zadní konec buňky.

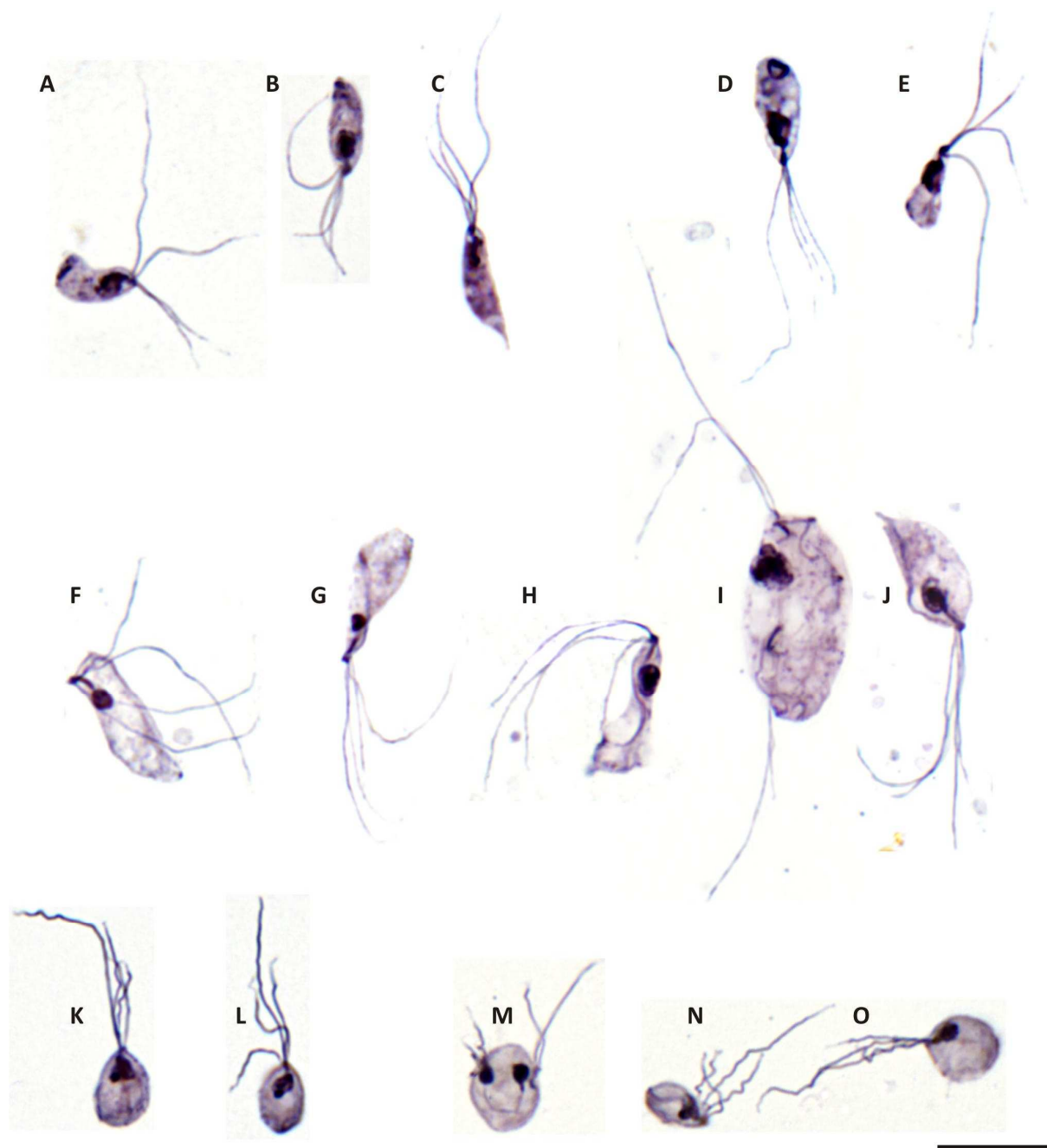


Obr. 13: *Monopylocystis visvesvarai* PC4BIC. A – buňka s viditelnými všemi čtyřmi bičíky; B – buňka při lovu bakterií; C – buňka při lovu bakterií, viditelný zašpičatělý konec těla; D – buňka při lovu bakterií; E – buňka s dobře viditelným cytostomem a zakulacenou zadní částí těla; F – mrtvá buňka s viditelnými bičíky; G – buňka při pohybu. Nomarského diferenciální interferenční kontrast, živé buňky (F je mrtvá buňka). Měřítka představují 10 µm.

Při morfologické charakterizaci prvoků označovaných v této studii jako *Percolomonas descissus*, *Percolomonas* sp. 1, heterolobosea EVROS2N gen. sp. a *Monopylocystis visvesvarai* bylo použito také barvení protargolem (**obr. 14**). Díky tomuto barvení bylo možné přesněji odhadnout relativní délky bičků vůči sobě (viz příslušné oddíly výše). U všech barvených zástupců těchto taxonů byly pozorované bičky akronematické. Kromě toho bylo prokázáno, že jádro je v buňkách těchto prvoků umístěno subapikálně. Naopak odlišně se u nich barvil cytoskelet cytostomu. U druhu *Monopylocystis visvesvarai* se velice dobře barvil cytoskelet potravní rýhy (**obr. 14H**). Poměrně dobře byl viditelný i v některých buňkách izolátu EVROS2N (**obr. 14N**). Naopak cytoskelet potravní rýhy *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. nebyl touto metodou výrazněji zviditelněn.

V případě izolátů EVROS2N a *Monopylocystis visvesvarai* PC4BIC se podařilo zachytit i dělicí se buňky (viz **obr. 14I** a **14M**). Přimenším organismus EVROS2N měl již ve fázi, kdy se od sebe oddělují dvě dvojice bičků, vytvořeny základy obou potravních rýh.

Buňky barvené protargolem byly průměrně menší než živé buňky, i když jejich tvar byl zachován. Výsledky měření bičíkovců na preparátech barvených protargolem viz **tab. 13**.

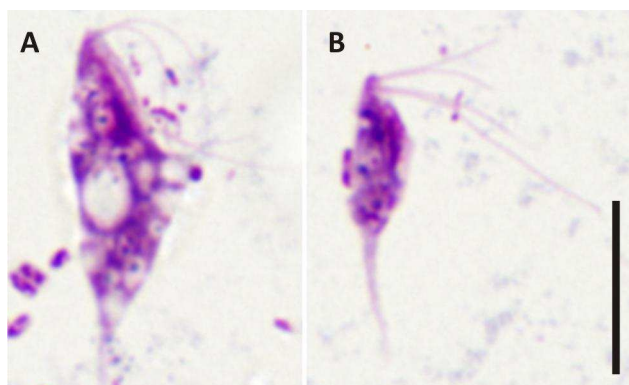


Obr. 14: Bičíkatá stádia druhů *Percolomonas* sp., *Percolomonas descissus*, *Monopylocystis visvesvarai* a *Heterolobosea* EVROS2N gen., sp. obarvená protargolem. A – C *Percolomonas* sp. z izolátu INDSIP; D – E *Percolomonas descissus* z izolátu TEXEL (D) a TOCOV (E); F – J *Monopylocystis visvesvarai* z izolátu PC4BIC (I – dělící se buňka); K – O izolát EVROS2N (M – dělící se buňka). Buňky na obrázcích A, B, E, H, I, J, K, L, M, N, O jsou skládané z fotografií několika rovin ostrosti. Měřítko představuje 10 μ m.

Tab. 13: Rozměry bičíkovců barvených protargolem.

DRUH	IZOLÁT	DÉLKA BUŇKY	ŠÍŘKA BUŇKY	POMĚR D/Š	n
<i>Percolomonas descissus</i>	TEXEL	8,5 ± 1,5 (4,6 – 10,8)	4,3 ± 0,8 (3,2 – 6,1)	2,0 (1,1 – 3,2)	30
<i>Percolomonas</i> sp. 1	INDSIP	7,1 ± 1,1 (5,4 – 11,0)	3,1 ± 0,5 (2,3 – 4,4)	2,3 (1,5 – 4,2)	30
<i>Monopylocystis visvesvarai</i>	PC4BIC	10,0 ± 1,6 (7,1 – 13,2)	4,6 ± 1,1 (2,7 – 6,9)	2,3 (1,5 – 4,2)	30
EVROS2N gen. sp.	EVROS2N	5,9 ± 0,6 (4,8 – 7,1)	4,1 ± 0,5 (3,2 – 5,1)	1,4 (1,1 – 2,2)	30

U druhu *Percolomonas descissus* bylo pokusně použito též barvení podle Giemsa-Romanowski (**obr. 15**). Toto barvení se ale díky fixaci za sucha ukázalo být jako méně vhodné, v ojedinělých případech však byl tvar buňky zachován. Na **obr. 15B** je zachycena typická forma s trnovitým výběžkem na zadním konci těla.

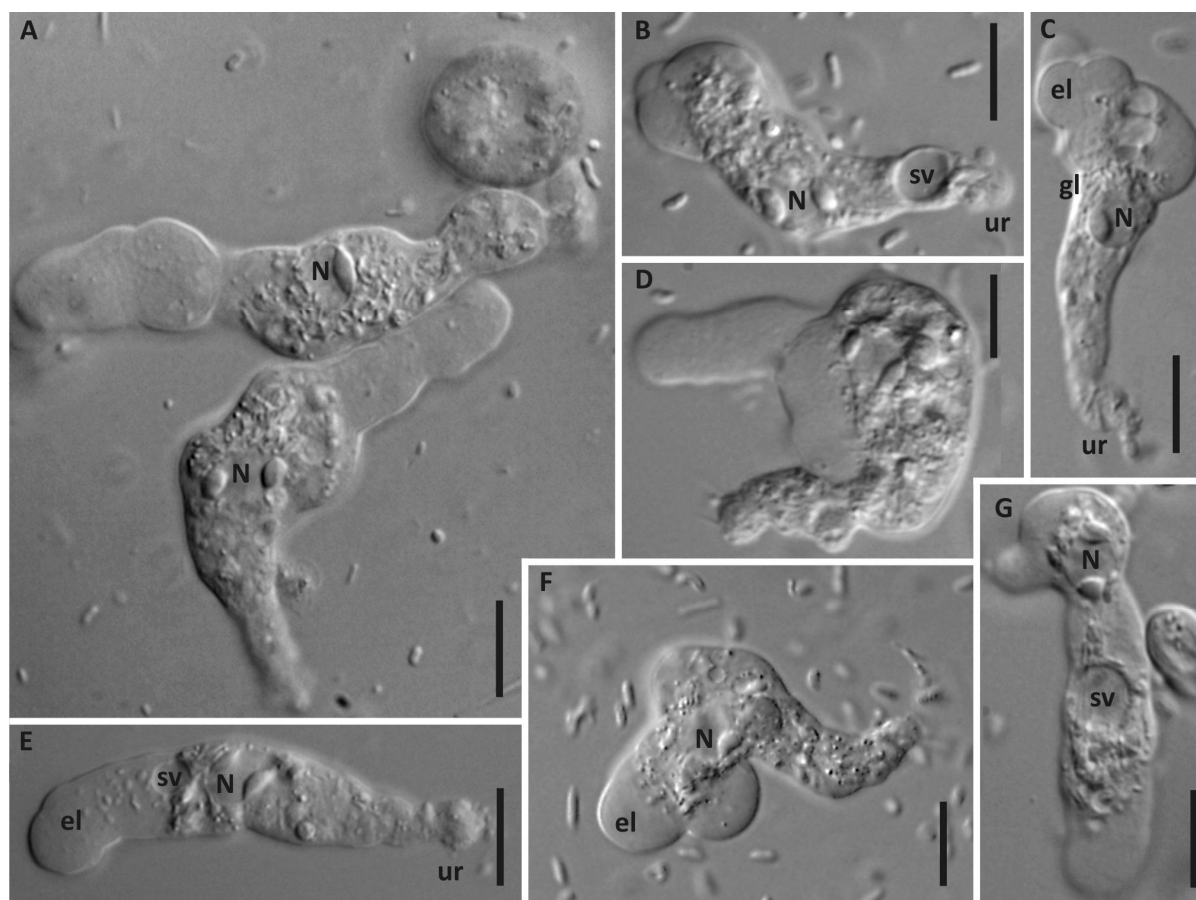


Obr. 15: Barvení izolátu *Percolomonas descissus* TEXEL podle Giemsa-Romanowski. A – buňka se zachovaným cytostomem; B – vřetenovitá buňka s patrnou délkou bičíků a pro tento druh charakteristickou špičkou na zadním konci těla. Měřítka představuje 10 µm.

Psalteriomonas lanterna

V kulturách VT2, VIT3, VIT5, VIT9 a CIZOV2 byly pozorovány pouze jednojaderné měňavky (sladkovodní) s eruptivními lobopodiemi (**obr. 16**). Jejich morfologie i ekologie koresponduje s originálním popisem měňavek druhu *Psalteriomonas lanterna*, a to včetně přítomnosti globule hydrogenosomů (Broers *et al.* 1990). Byly však zaznamenány i morfologické znaky, které jsou s tímto popisem v rozporu. U všech izolátů sledovaných v této studii byla opakovaně pozorována dvě (někdy jedno) parietální jádérka umístěná na protilehlých stranách jádra (**obr. 16A**), zatímco jediný dosud známý izolát *P. lanterna* měl jádérko centrální (Broers *et al.* 1990). Oproti tomuto originálnímu izolátu nebylo také nikdy pozorováno bičíkaté stádium.

Velikost buněk byla měřena na lokomotivních formách zaživa (n=50), a to u několika pasáží izolátů VIT3, VIT5 a VT2 kultivovaných na ATCC 802 médiu. Jedinci izolátu VT2 měli délku těla $47,5 \pm 8,1$ (28,9 – 63,1) μm a šířku $10,8 \pm 2,0$ (7,1 – 15,1) μm . Jedinci izolátu VIT3 měli délku těla $47,5 \pm 7,1$ (32,1 – 63,7) μm a šířku $12,2 \pm 2,2$ (7,2 – 18,0) μm . Buňky izolátu VIT5 byly dlouhé $44,3 \pm 6,7$ (31,4 – 60,2) μm a široké $10,1 \pm 1,9$ (6,8 – 14,1) μm . Průměrný poměr délky šířky buňky byl 4,1 (VIT3), 4,5 (VIT5) a 4,5 (VT2). Průměr délky lokomotivní formy za všechny tři měřené izoláty *P. lanterna* byl $46,4 \pm 7,4$ (28,9 – 63,7) μm , šířky pak $11,0 \pm 2,2$ (6,8 – 18,0) μm a průměrný poměr délky a šířky byl 4,4.



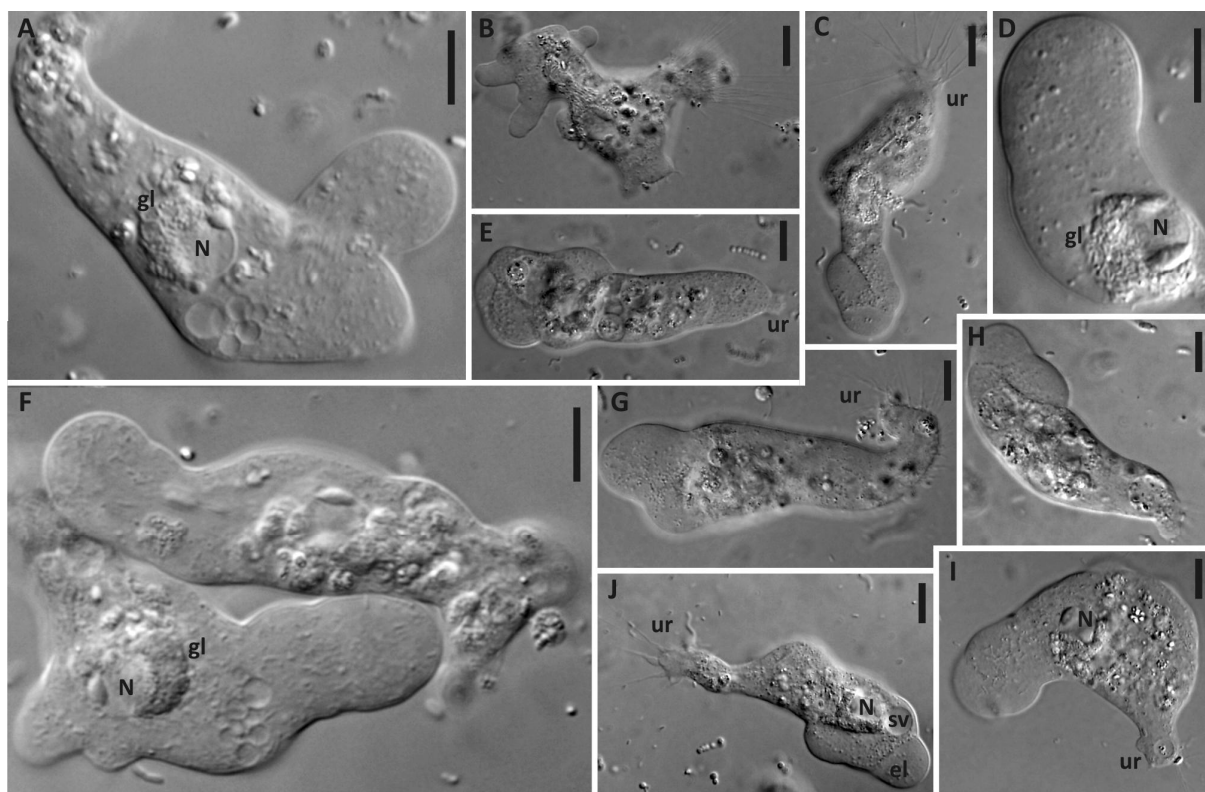
Obr. 16: Lokomotivní formy druhu *Psalteriomonas lanterna*. A – izolát VIT3; B – D izolát VT2; E – izolát VIT3; F – G izolát VT2. Vysvětlivky: el – erupтивní lobopodie; gl – globule hydrogenosomů; N – jádro s jádérky; sv – stažitelná vakuola; ur – uroid. Foceny byly pouze živé buňky. Nomarského diferenciální interferenční kontrast. Měřítka představují délku 10 μm .

***Psalteriomonas* sp. 1**

Pouze améby (jednojaderné, sladkovodní) byly pozorovány také v případě izolátů KIZ, CERETE a IND7 (**obr. 17**). Tyto améby mají erupтивní lobopodie (**obr. 17J**), výraznou globuli hydrogenosomů v blízkosti jádra (**obr. 17A, 17D, 17F**) a jedno či dvě parietální jádérka

umístěná na protilehlých pólech jádra (**obr. 17A, 17D, 17F, 17I, 17J**). Často byla na uroidu patrná řada uroidálních filament (viz **obr. 17C, 17E, 17G, 17J, 17I**). Žádná bičíkatá stádia ani cysty nebyly zaznamenány (cca 150 pasáží). Velikost buněk byla měřena zaživa (n=50). Buňky izolátu KIZ byly $72,2 \pm 11,8$ (49,9 – 102,3) μm dlouhé a $16,4 \pm 4,0$ (8,1 – 30,0) μm široké. Průměrný poměr mezi délkou a šířkou buněk byl u tohoto izolátu 4,6. Buňky izolátu CERETE byly $65 \pm 9,1$ (50,1– 90,8) μm dlouhé a $14,7 \pm 2,3$ (10,2 – 19,0) μm široké. Průměrný poměr délky šířky buňky byl u tohoto izolátu 4,5. Buňky izolátu IND7 byly $66,2 \pm 8,6$ (40,1 – 82,9) μm dlouhé a $14,9 \pm 2,4$ (10,0 – 23,1) μm široké. Průměrný poměr délky šířky buňky byl u tohoto izolátu 4,6.

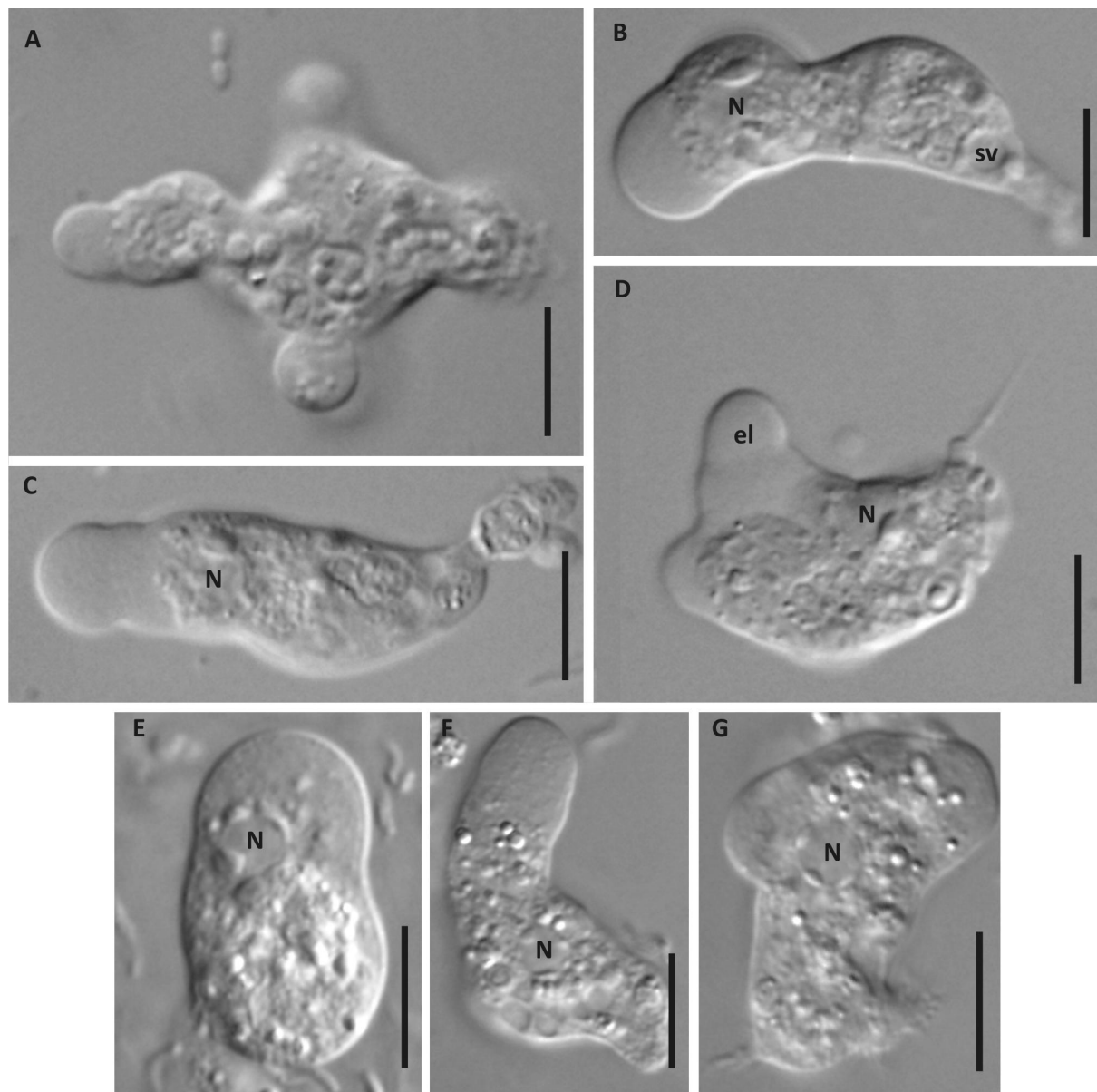
Průměrná délka buňky (počítaná přes všechny naměřené buňky tohoto nového druhu) byla $67,8 \pm 10,4$ (40,1 – 102,3) μm , šířka pak $15,3 \pm 3,1$ (8,1 - 30,0) a průměrný poměr délky šířky buňky byl 4,5. Oproti studovaným izolátům *P. lanterna* je tedy druh *Psalteriomonas* sp. 1 výrazně větší.



Obr. 17: Lokomotivní formy *Psalteriomonas* sp. 1. A – I izolát KIZILLAR; J – izolát IND7. Vysvětlivky: el – eruptivní lobopodie; gl – globule hydrogenosomů; N – jádro s jadérky; sv – stažitelná vakuola; ur – uroid. Foceny byly pouze živé buňky, výjimkou je obrázek 16-D, na němž je umírající buňka. Na této buňce je dobře viditelná globule hydrogenosomů a dvě parietální jadérka. Nomarského diferencíální interferenční kontrast. Měřítka představují délku 10 μm .

Sawyeria marylandensis

Jednojaderné sladkovodní améby s eruptivními lobopodiemi, které byly izolovány ze vzorků ITZAVL, LUH2 a LUH3 (**obr. 18**), nemají na rozdíl od *Psalteriomonas lanterna* a *Psalteriomonas* sp. 1 globuli hydrogenosomů a korespondují s originálním popisem druhu *Sawyeria marylandensis* (O’Kelly et al. 2003).



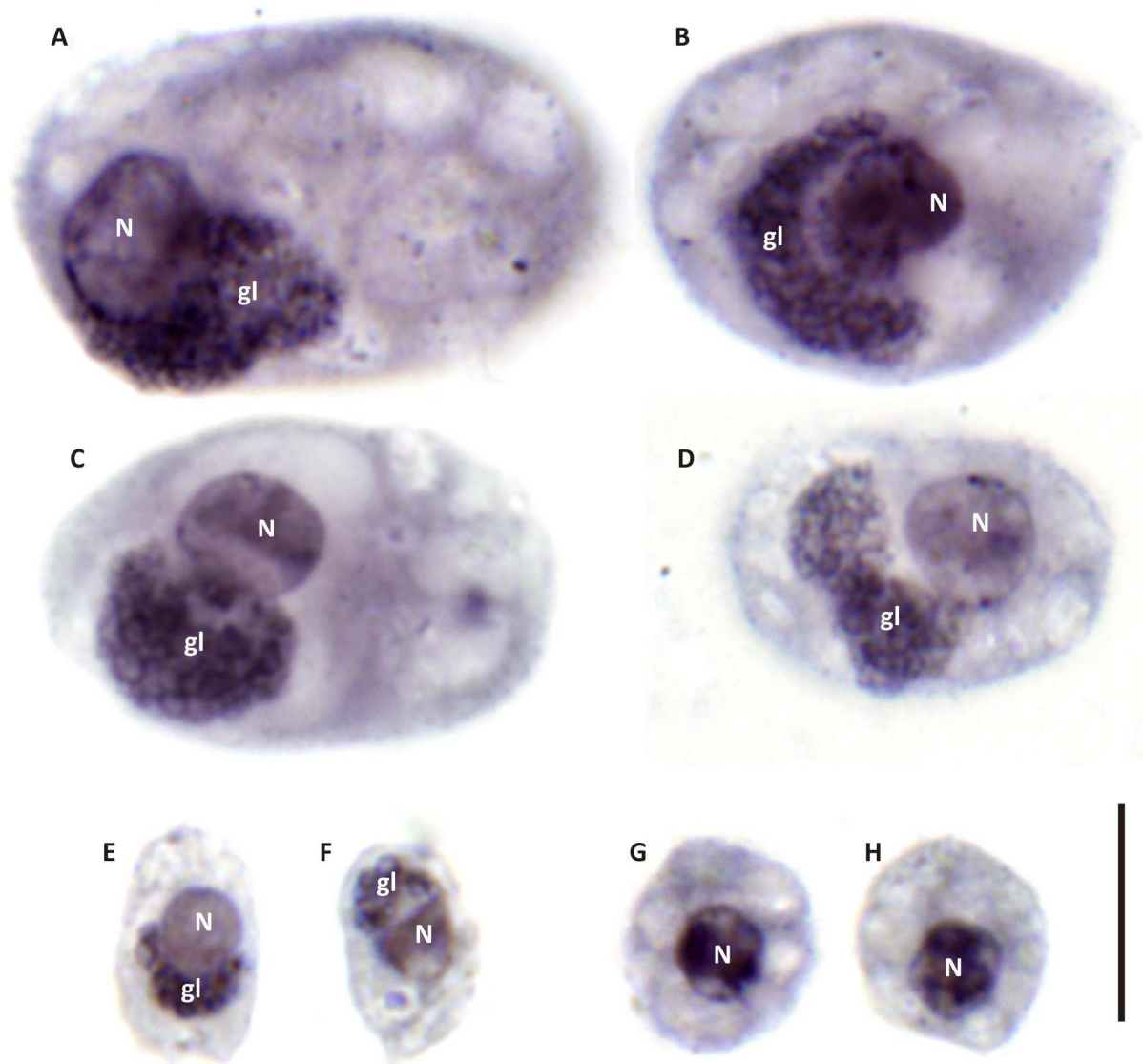
Obr. 18: *Sawyeria marylandensis* pozorovaná. A – D izolát ITZAVL; E – G izolát LUH3. Vysvětlivky: el – eruptivní lobopodie; N – jádro s jadérky; sv – stažitelná vakuola. Nomarského diferenciální interferenční kontrast, živé buňky. Měřítka představují délku 10 µm.

Velikost buněk byla měřena zaživa (n=50), a to u několika pasáží izolátů LUH3 a ITZAVL kultivovaných na ATCC 802 médiu. Délka buňky byla u izolátu ITZAVL $41,1 \pm 11,9$ (17,1 –

69,8) μm a šířka $9,5 \pm 2,0$ (5,9 – 14,3) μm . Průměrný poměr délky šířky buňky byl u tohoto izolátu 4,4. U izolátu LUH3 byla délka buňky $34,0 \pm 6,3$ (22,0 – 51,5) μm a šířka $9,6 \pm 2,5$ (5,4 – 16,7) μm . Průměrný poměr mezi délkou a šířkou buněk byl u tohoto izolátu 3,7. Průměrný poměr mezi délkou a šířkou měřených buněk obou izolátů *S. marylandensis* dohromady byl 4,0. Průměrná délka buňky *S. marylandensis* v těchto izolátech byla $37,6 \pm 10,1$ (17,1 – 69,8) μm , šířka pak $9,5 \pm 2,3$ (5,4 - 16,7). Zatímco u izolátu ITZAVL je stejně jako v případě originálního popisu (O'Kelly *et al.* 2003) patrné jedno či dvě parietální jadérka na opačných pólech jádra, v případě izolátu LUH3 bylo pozorováno více malých jadérek umístěných na okrajích jádra (**obr. 18G**).

Barvení protargolem se ukázalo být velmi účinným, pokud jde o rozlišení rodu *Sawyeria* a *Psalteriomonas*, neboť velmi dobře barví globule hydrogenosomů a bakterií (viz **obr. 19A – 19F**). Na tomto obrázku je také vidět, že tato globule je u druhu *Psalteriomonas* sp. 1 výrazně větší než u druhu *P. lanterna*. Naopak jadérka tímto barvením nejsou zřetelně zviditelněna.

Rozměry izolátů měňavek zkoumaných druhů jsou uvedeny v **tab. 14**.



Obr. 19: Měňavkovitá stádia druhů *Psalteriomonas lanterna*, *Psalteriomonas* sp. 1 a *Sawyeria marylandensis* obarvená protargolem. A – D *Psalteriomonas* sp. z izolátu KIZILLAR; E – F *Psalteriomonas lanterna* z izolátu VIT5; G – H *Sawyeria marylandensis* z izolátu ITZAVL. Vysvětlivky: gl – globule hydrogenosomů; N – jádro. Měřítko představuje 10 μ m.

Tab. 14: Rozměry měňavek barvených protargolem.

DRUH	IZOLÁT	DÉLKA BUŇKY	ŠÍŘKA BUŇKY	POMĚR D/Š	n
<i>Psalteriomonas lanterna</i>	VIT5	$10,0 \pm 2,8$ (6,0 – 18,1)	$6,3 \pm 1,0$ (4,4 – 7,9)	1,6 (1,0 – 2,5)	20
<i>Psalteriomonas</i> sp. 1	KIZILLAR	$19,7 \pm 4,1$ (12,9 – 26,6)	$12,0 \pm 1,6$ (8,7 – 13,9)	1,6 (1,3 – 1,9)	20
<i>Sawyeria marylandensis</i>	ITZAVL	$9,2 \pm 1,8$ (6,9 – 12,0)	$6,6 \pm 1,6$ (4,4 – 9,6)	1,4 (1,1 – 2,0)	20

Organismus PC4AM

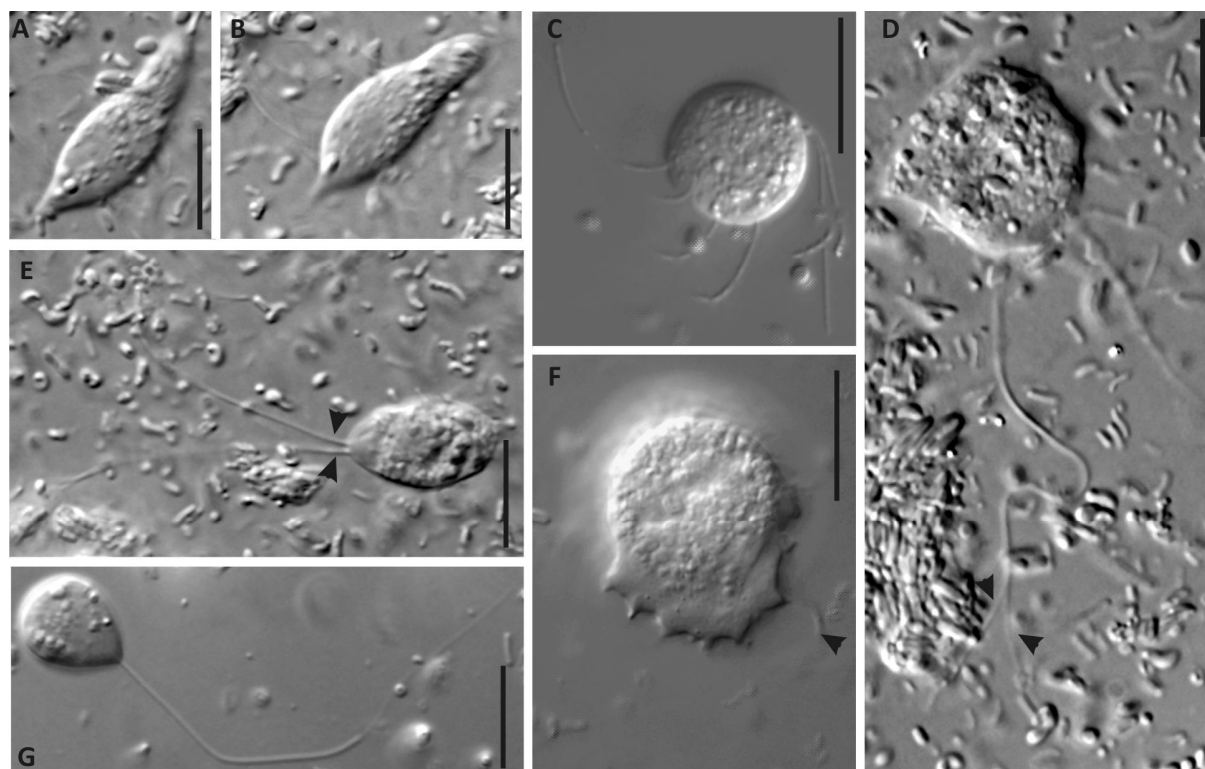
V monoeukaryotické kultuře PC4AM byl pozorován bizarní mořský organismus. Ten má tři hlavní životní fáze: (1) kulovité buňky s 0 – 2 dlouhými bičíky (**obr. 20G a 20E**); (2) velké měňavky s 1 – 2 dlouhými bičíky a lobopodiemi, které však nejsou eruptivní (**obr. 20D, 20F a obr. 22**); (3) mnohobičíkaté stádium („mnohobičíkovce“) se 2 předními bičíky a 12 bičíky po obvodu buňky. Tyto bičíky směřují při pohybu posterolaterálně (**obr. 20A – C, 21J – N**). Přední bičíky mnohobičíkovce jsou patrně homologické s bičíky měňavkovitého a kulovitého stádia. Na zadním konci těla mnohobičíkovce byl obvykle pozorován trnovitý výběžek. Pohyb tohoto stádia byl velmi rychlý, zatímco buňky ostatních stádií se pohybovaly jen velmi pomalu nebo vůbec. Cytostom nebyl pozorován u žádného životního stádia. Na přední části buňky měňavkovitého stádia byla v blízkosti jádra patrná přítomnost cytoskeletárních pásů, které tuto část buňky vyztužovaly (**obr. 22K**).

Barvení protargolem potvrdilo přítomnost řady cytoskeletárních struktur uvnitř měňavkovitých buněk. Tyto struktury však nemají přesně definovaný průběh (liší se buňku od buňky) (viz **obr. 21A – I**). Na konci bičíků jsou velmi často patrné smyčky, které jsou také poměrně neobvyklé (není jisté, zda nejsou arteficiální, ale u jiných organismů při barvení protargolem nevznikají). Z protargolového barvení vyplývá, že poměrně velké jádro je umístěno poblíž předního konce buňky a obklopuje jej řada cytoskeletárních útvarů vycházejících z prostoru báze předního bičíku (**obr. 21E**). Tvar jádra je unikátní a jeho podoba mezi jednotlivými stádii je jedním z důkazů, že se jedná o různé životní formy téhož organismu. Charakteristické je jeho zaškrcení zhruba v polovině délky a jeho podlouhlý tvar (**obr. 21P a 21Q**). Podařilo se také zachytit dělící se buňku (**obr. 21O**).

Velikost buňky byla měřena jak zaživa, tak na protargolových preparátech, a to na třech typech buněk: (1) na kulovitých buňkách s bičíkem nebo bez bičíku, které jsou v kultuře jednoznačně nejčastější formou; (2) na měňavkovitých buňkách s jedním či dvěma bičíky a (3) na mnohobičíkovci, který je v kultuře velice vzácný. Vzhledem k velmi různé frekvenci výskytu těchto stádií v kultuře se též značně liší i počet měřených jedinců.

Kulovité buňky s jedním bičíkem ($n=30$) byly zaživa dlouhé $10,8 \pm 2,1$ (6,8 – 14,8) a široké $8,2 \pm 1,1$ (6,3 – 10,1). Poměr mezi jejich délkou a šířkou byl 1,3 (1,0 – 1,9). Bičíky byly cca 4 – 5x delší než buňka. Měňavkovité buňky ($n=15$) byly dlouhé $19,0 \pm 3,1$ (15,8 – 24,5) a široké $10,6 \pm 2,3$ (7,8 – 15). Poměr mezi jejich délkou a šířkou byl 1,8 (1,4 – 3,0). Bičíky byly cca 4x delší

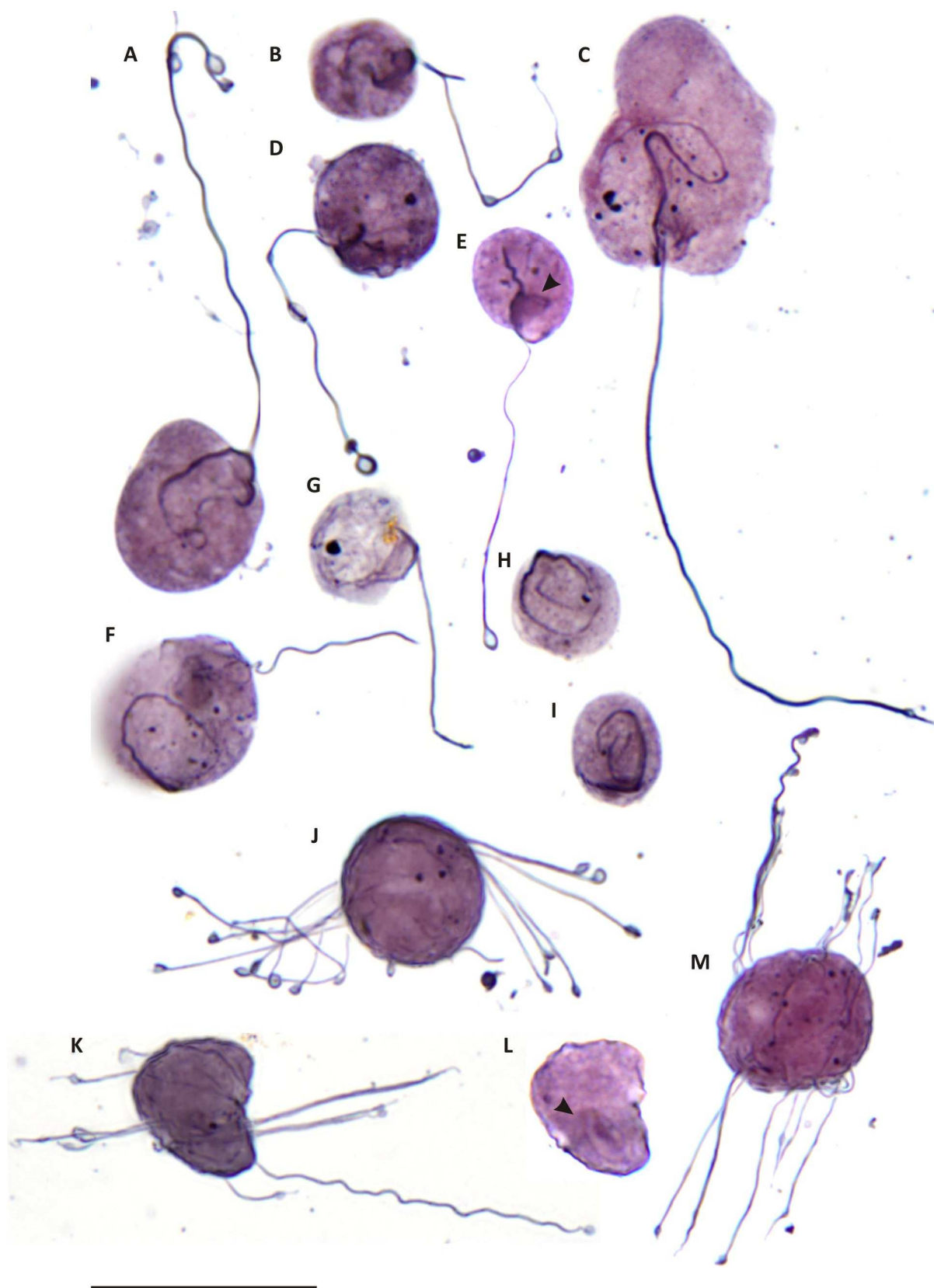
než buňka. Mnohobičíkovci byly dlouzí okolo 25 μm a širocí okolo 8,5 μm . Dva bičíky při pohybu mnohobičíkovce směřovali vpřed a byli umístěny na předním konci buňky, ostatní (pravděpodobně 12) jsou umístěny po obvodu buňky. Výsledky měření těchto forem na protargolových preparátech jsou v **tab. 15**.



Obr. 20: Organismus PC4AM pozorovaný. A – C mnohobičíkaté stádium; D – E dvoubičíkatá forma; F – měňavkovitá forma; G – kulovitá forma s jedním bičíkem. Vysvětlivky: šipky označují bičíky v obrázcích D – E. Nomarského diferenciální interferenční kontrast, živé buňky. Měřítka představuje 10 μm .

Tab. 15: Rozměry hlavních životních forem organismu PC4AM barvených protargolem.

ŽIVOTNÍ FORMA	IZOLÁT	DÉLKA BUŇKY	ŠÍŘKA BUŇKY	POMĚR D/Š	n
Kulovité buňky	PC4AM	$9,7 \pm 1,7$ (6,4 – 12,4)	$8,7 \pm 1,7$ (5,7 – 12,7)	1,1 (1,0 – 1,4)	20
Měňavkovité buňky	PC4AM	$14,0 \pm 2,4$ (11,4 – 21,5)	$10,5 \pm 2,5$ (6,5 – 15,5)	1,4 (1,0 – 2,0)	20
Mnohobičíkovec	PC4AM	$12,2 \pm 2,3$ (8,9 – 16,8)	$10,1 \pm 1,6$ (7,4 – 12,4)	1,2 (1,0 – 1,4)	10

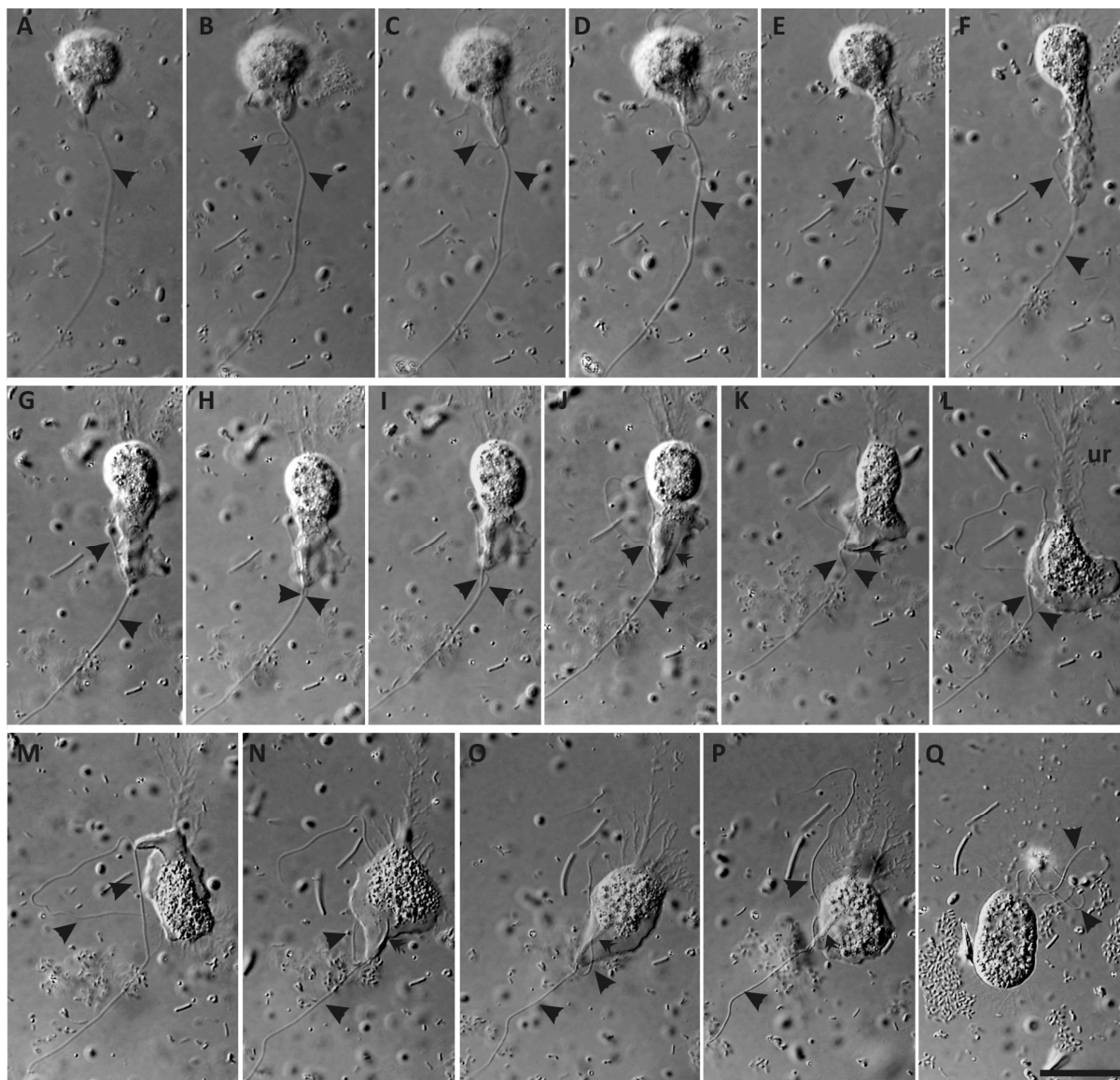


Obr. 21-I: Organismus PC4AM barvený protargolem. A – G jednobíčíkaté formy s viditelným cytoskeletem a panožkami; H – I bezbíčíkaté buňky; J – M mnohobíčíkatá forma. Buňky na všech obrázcích jsou skládané z fotografií několika rovin ostrosti. Obrázek L představuje jednu rovinu ostrosti buňky z obrázku K, je zde dobře vidět jádro. Vysvětlivky: šipky označují buněčné jádro. Měřítko představuje 20 μm .



Obr. 21-II: Organismus PC4AM barvený protargolem. N – mnohobičíkatá forma s viditelnými dvěma bičíky na vrcholu buňky a postranními 12 bičíky; O – dělící se buňka; P – jádro mnohobičíkovce; Q – jádro kulovité buňky s jedním bičíkem. Vysvětlivky: šipky označují jádro. Jednotlivé obrázky vznikly složením fotografií různých buněčných rovin. Měřítko představuje 10 μ m.

Během pozorování pohybu měňavkovité buňky byla pořízena sekvence fotografií, která zobrazuje přechod ze stádia améby s jedním předním bičíkem do stádia améby s dvěma předními bičíky (**obr. 22**). Pravděpodobně došlo k externalizaci 2. bičíku. Byl také zdokumentován pomalý pohyb měňavky přisedlé na sklíčko. Na **obr. 22K – P** je zřetelný cytoskelet vycházející z prostoru báze bičíků a procházející kolem jedné stěny jádra, který kontrastuje se ztrátou konkrétního tvaru u zbytku těla. Patrný je i výrazný uroid.



Obr. 22: Sekvence fotografií zaznamenávající 36 minut pohybu měňavkovité formy organismu PC4AM.
Vysvětlivky: ur – uroid; jednoduché šipky označují axonemy bičíků (je patrná postupná externalizace 2. bičíku); dvojité šipky označují cytoskelet v blízkosti jádra. Nomarského diferenciální interferenční kontrast. Měřítko představuje 20 μ m.

4.6. Ultrastruktura

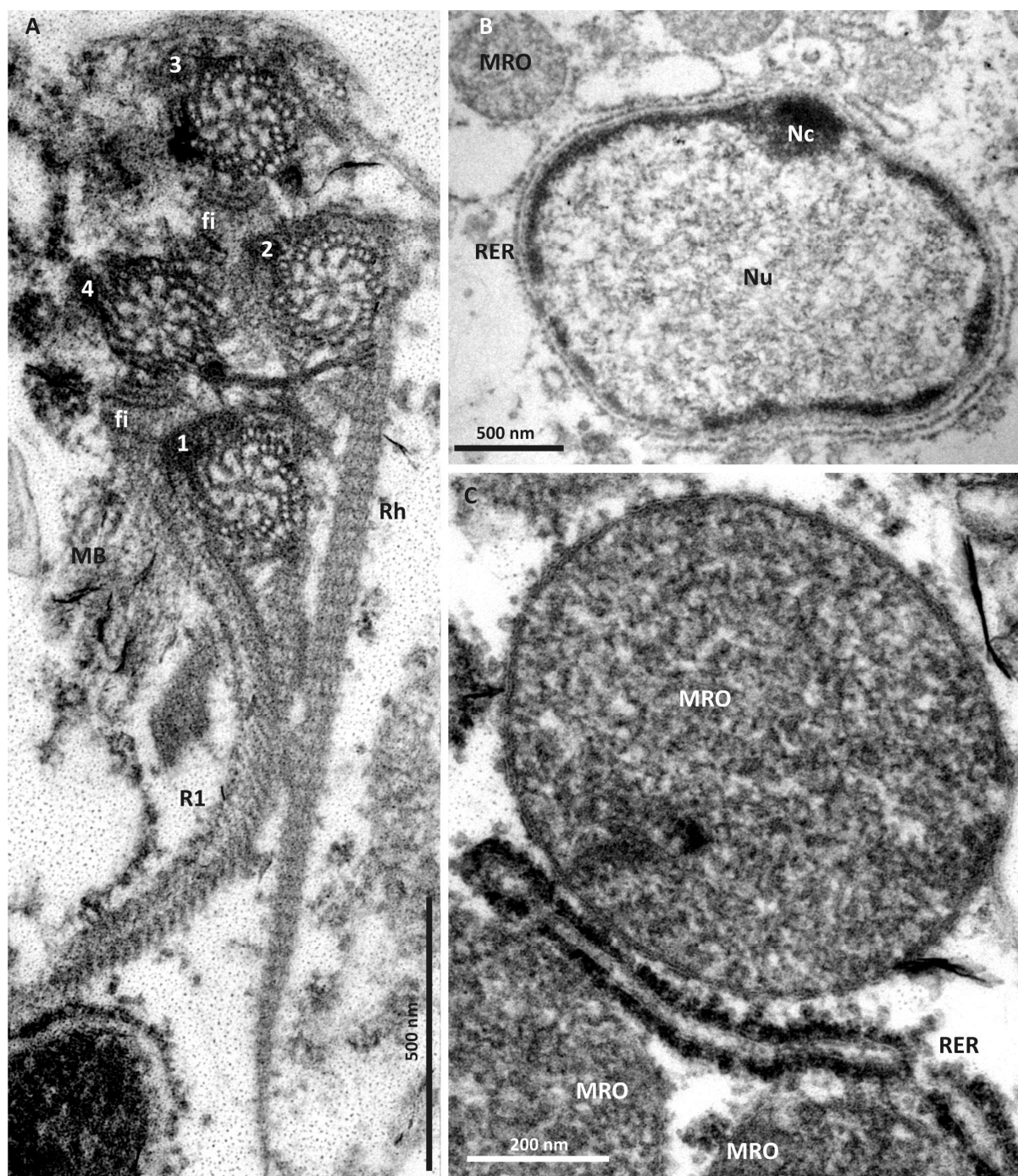
Monopylocystis visvesvarai

Při této transmisně-elektronmikroskopické studii byl důraz kladen zejména na strukturu mastigontu, jádra a mitochondrie. Mastigont izolátu *Monopylocystis visvesvarai* se skládá ze 4 bazálních tělísek, 4 axonem, rhizoplastu, struktury R1 a svazku mikrofilament (MB). Kromě toho bazální tělíska vzájemně propojuje řada drobných, krátkých fibril (viz **obr. 23A**). Bazální tělíska jsou uspořádána ve dvou párech, přičemž bazální tělíska #1, #4 tvoří posteriorní pár a bazální tělíska #2, #3 tvoří anteriorní pár. Na řezu je také velmi dobře patrná struktura

bazálních tělísek, která má klasickou podobu, tedy devět trojic mikrotubulů (viz **obr. 23A**). Z blízkosti bazálního tělíska #2 vychází žíhaný rhizoplast. Kromě toho je patrná i krátká vedlejší větve rhizoplastu odbočující k bazálnímu tělísku #1. Periodicita žíhání rhizoplastu je okolo 38 nm. K bazálnímu tělísku #1 je také připojena struktura R1, která má podobu zahnuté řady mikrotubulů (**obr. 23A**). Poslední dobře patrnou strukturou na řezu mastigontem *M. visvesvarai* je svazek mikrofilament (MB; **obr. 23A**). Ten propojuje kořeny 1. a 4. bičíku na jednom konci a R1 na konci opačném, čímž vytváří charakteristický harfovitý útvar. Stejně je tomu u rodů *Psalteriomonas* a *Lyromonas* a u druhu *Percolomonas descissus* (Broers *et al.* 1990; Broers *et al.* 1993; Brugerolle & Simpson 2004).

Buňky *M. visvesvarai* PC4BIC jsou jednojaderné. Jádro má nepravidelný obrys. Jadérko má podobu tenké vrstvy a je přitisklé na jadernou membránu (**obr. 23B**). Jádro je těsně obklopeno drsným endoplasmatickým retikulem (**obr. 23B**).

Mitochondriální deriváty jsou kulovité, o průměru 700 – 780 nm, bez viditelných krist. Je patrná jejich asociace s drsným endoplasmatickým retikulem (**obr. 23C**). *Stacked Golgi* komplex nebyl pozorován.



Obr. 23: Buněčná struktura bičíkatého stádia *Monopylocystis visvesvarai* PC4BIC. A – podélný řez mastigontem; B – řez jádrem; C – řez mitochondriálním derivátem bez krist. Vysvětlivky: Fi - řada drobných, krátkých fibril propojujících bazální tělíska; MB – svazek mikrofilament; Nc – jadérko; Nu – jádro; RER – drsné endoplasmatické retikulum; Rh – rhizoplast; R1 – struktura R1; 1, 2, 3, 4 – bazální tělíska bičíků. Měřítka jsou uvedena na obrázcích.

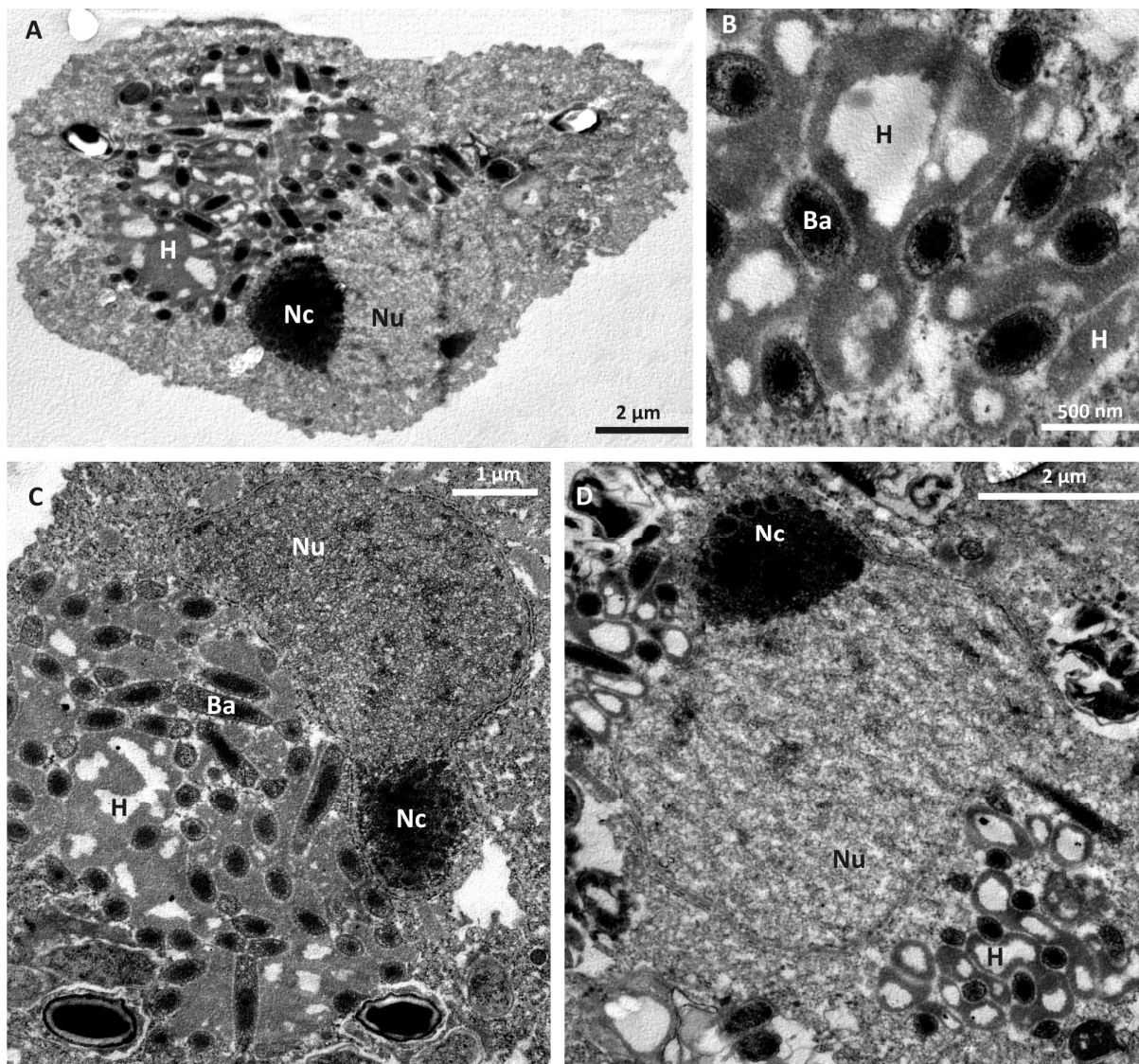
***Psalteriomonas* sp. 1**

Elektronmikroskopická studie byla zaměřena zejména na potvrzení přítomnosti globule hydrogenosomů u měňavkovitého stádia tohoto druhu. Barvení protargolem nebylo považováno za dostatečně silný důkaz přítomnosti této globule, neboť bylo na prokázání přítomnosti globule použito poprvé až v této studii (anaerobní *Heterolobosea* barvena protargolem také doposud nikdy nebyla). Dosud publikované světelně mikroskopické fotografie této globule u druhu *P. lanterna* byly omezeny na bičíkaté stádium.

Na řezech celou buňkou je dominantní strukturou jádro a na něj nasedlá globule hydrogenosomů a bakterií (**obr. 24**), což velmi dobře odpovídá pozorování buněk barvených protargolem. V buňkách je velmi dobře zachovaná cytoplazma, nejsou patrné žádné stopy po bazálních těliscích ani jiných částech mastigontu. *Stacked* Golgiho komplex také není viditelný.

Jádro zcela odpovídá pozorování buněk tohoto druhu ve světelném mikroskopu. Vyznačuje se jedním či dvěma jadérky umístěnými v lalocích na protilehlých jaderných pólech (viz **obr. 24A, 24C, 24D**).

Globule hydrogenosomů obsahuje četné prokaryotické symbionty, pravděpodobně methanogenní archebakterie (**obr. 24B**). Hydrogenosomy mají nepravidelný tvar. Délka hydrogenosomů v globuli je velice rozmanitá. V nejdelším místě mohou hydrogenozomy dosahovat až 2 μm . Solitérní hydrogenozomy nebyly pozorovány.



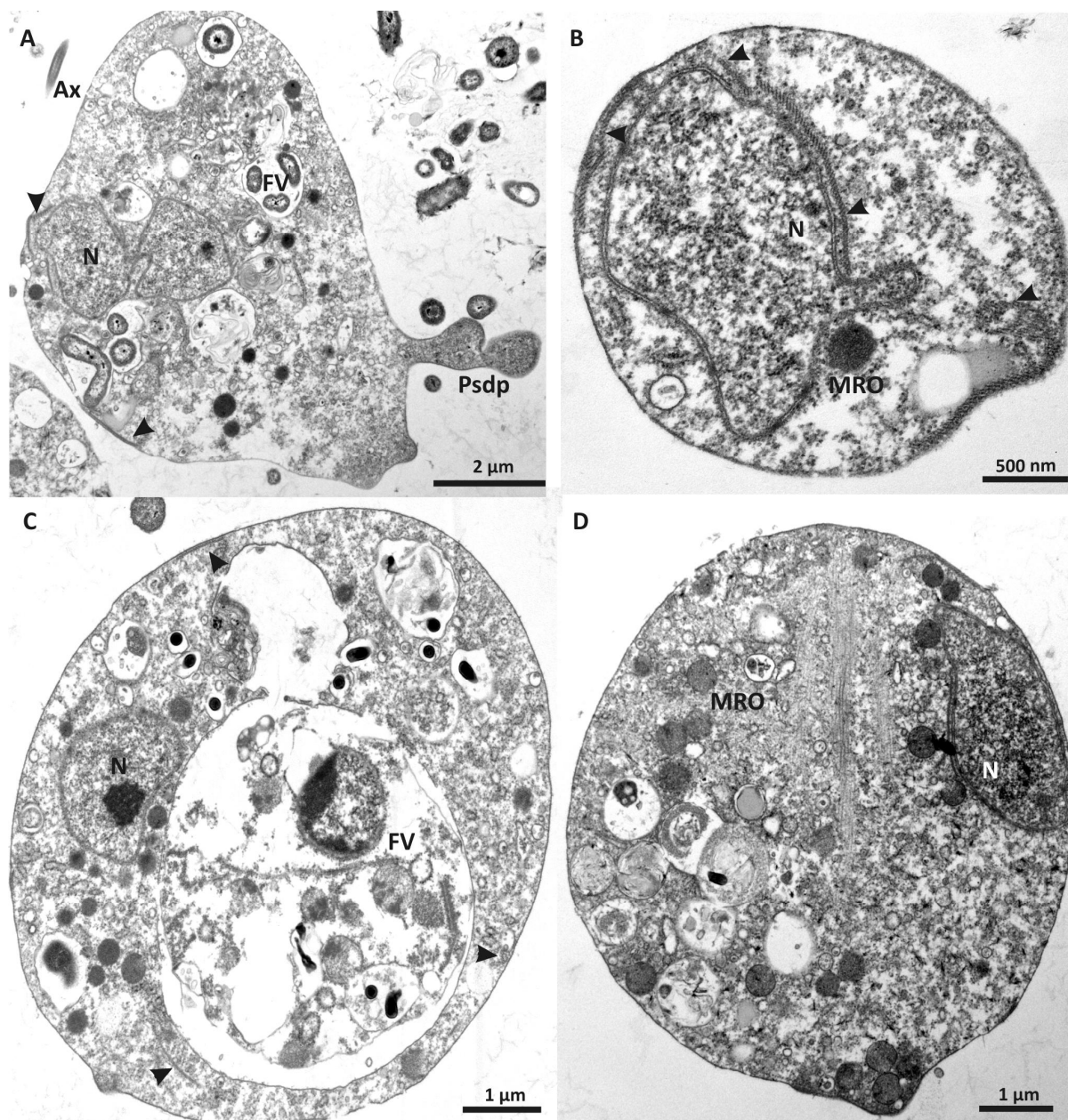
Obr. 24: Buněčná struktura měňavky *Psalteriomonas* sp. KIZILLAR. A – řez celou buňkou; B – detail řezu globulí hydrogenozomů; C – D řez oblastí jádra a na něj nasedající globule hydrogenosomů. Vysvětlivky: Ba – symbiotické bakterie vyskytující se v globuly hydrogenosomů; Nc – jadérko; Nu – jádro; H - hydrogenosom. Měřítka jsou uvedena na obrázcích.

PC4AM

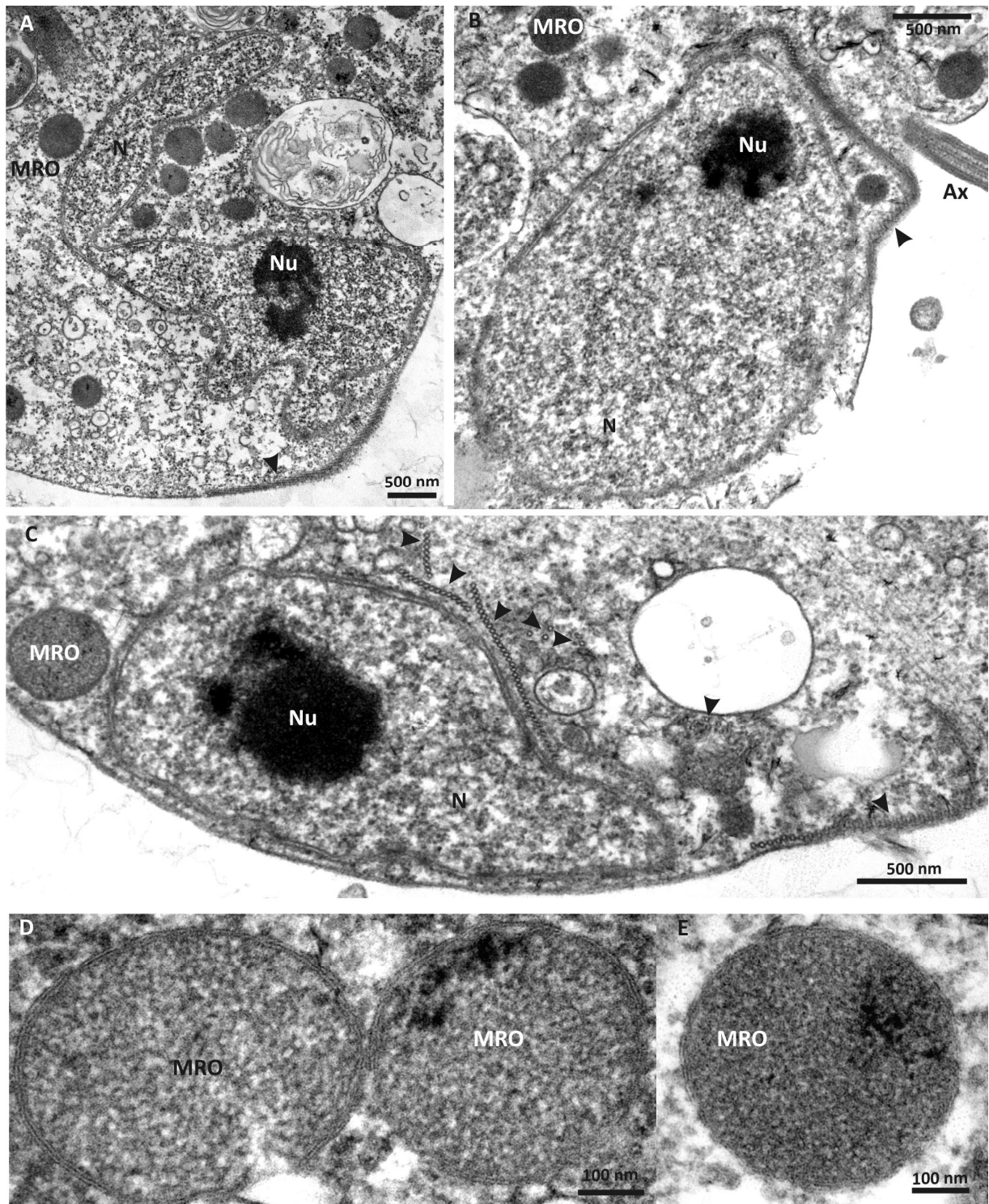
Úkolem této transmisně-elektronmikroskopické studie byla charakterizace buněčné struktury u bizarního organismu prozatímne označovaného jako PC4AM. Naprosto dominantními životními formami v kultuře jsou (1) kulovitá buňka s jedním bičíkem a (2) velká měňavkovitá forma, z toho důvodu patří prezentované buněčné řezy těmito dvěma formám.

Na řezech celou buňkou je patrná poloha jádra, které se nachází poblíž mastigontu na předním konci buňky (**obr. 25A**). Mikrotubulární pásy je možné vidět i mimo prostor

předního konce buňky (**obr. 25**). Není pochyb, že i měňavkovitá forma organismu PC4AM obsahuje poměrně značné množství cytoskeletu. Patrné jsou i četné potravní vakuoly obsahující bakterie (např. **obr. 25A**) nebo eukaryota (obr. 25C, v tomto případě se jedná o bičíkovce druhu *Monopylocystis visvesvarai*, který byl do kultury PC4AM pokusně přidán).



Obr. 25: Řez celou buňkou organismu PC4AM. A – podélný řez buňkou měňavkovitou buňkou; B – příčný řez buňkou; C – řez buňkou PC4AM, která má v potravní vakuole pohlceného eukaryota PC4BIC; D – řez buňkou s množstvím mitochondriálních derivátů. Vysvětlivky: Ax – axonema bičíku; FV – potravní vakuola; MRO – mitochondriální deriváty; N – jádro; Psdp – panožka (pseudopodie); jednoduché šipky – mikrotubuly. Měřítka jsou uvedena na obrázcích.



Obr. 26. Detailní řezu jádrem a mitochondriálními deriváty organismu PC4AM. A – C detailní řezu jádrem s viditelným centrálním jádrem; D – detailní řezu mitochondriálních derivátů bez krist. Vysvětlivky: Ax – axonema bičíku; FV – potravní vakuola; MRO – mitochondriální deriváty; N – jádro; Nu – jádérko; jednoduché šípky – mikrotubuly. Měřítka jsou uvedena na obrázcích.

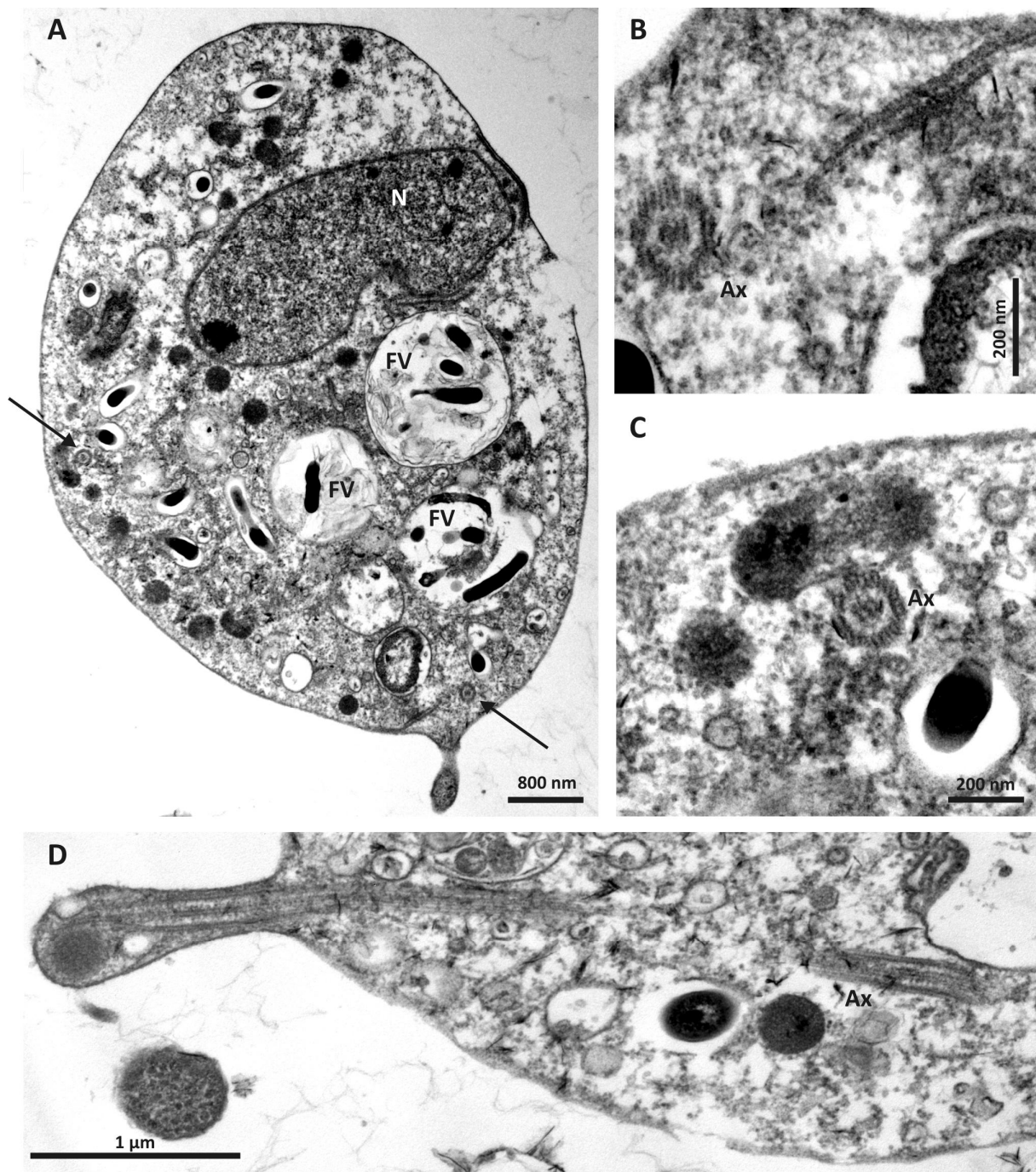
Jádro má v podélném i příčném průřezu velmi nepravidelný tvar (**obr. 25A a 26A – C**) a v určitém regionu může být výrazně zúžené (**obr. 26A**). Jadérko je centrální (**obr. 26A – 26C**). *Stacked* Golgiho komplex není patrný. Drsné endoplasmatické retikulum není výrazné.

Mitochondriální deriváty jsou kulovité a nemají vytvořeny krysty (**obr. 26D – 26E**). Nejsou asociovány s drsným endoplasmatickým retikulem. Jejich průměr se pohybuje okolo 500 nm. V buňce PC4AM jsou mitochondriální deriváty přítomny v mnoha kopiích (**obr. 25D, 26A**).

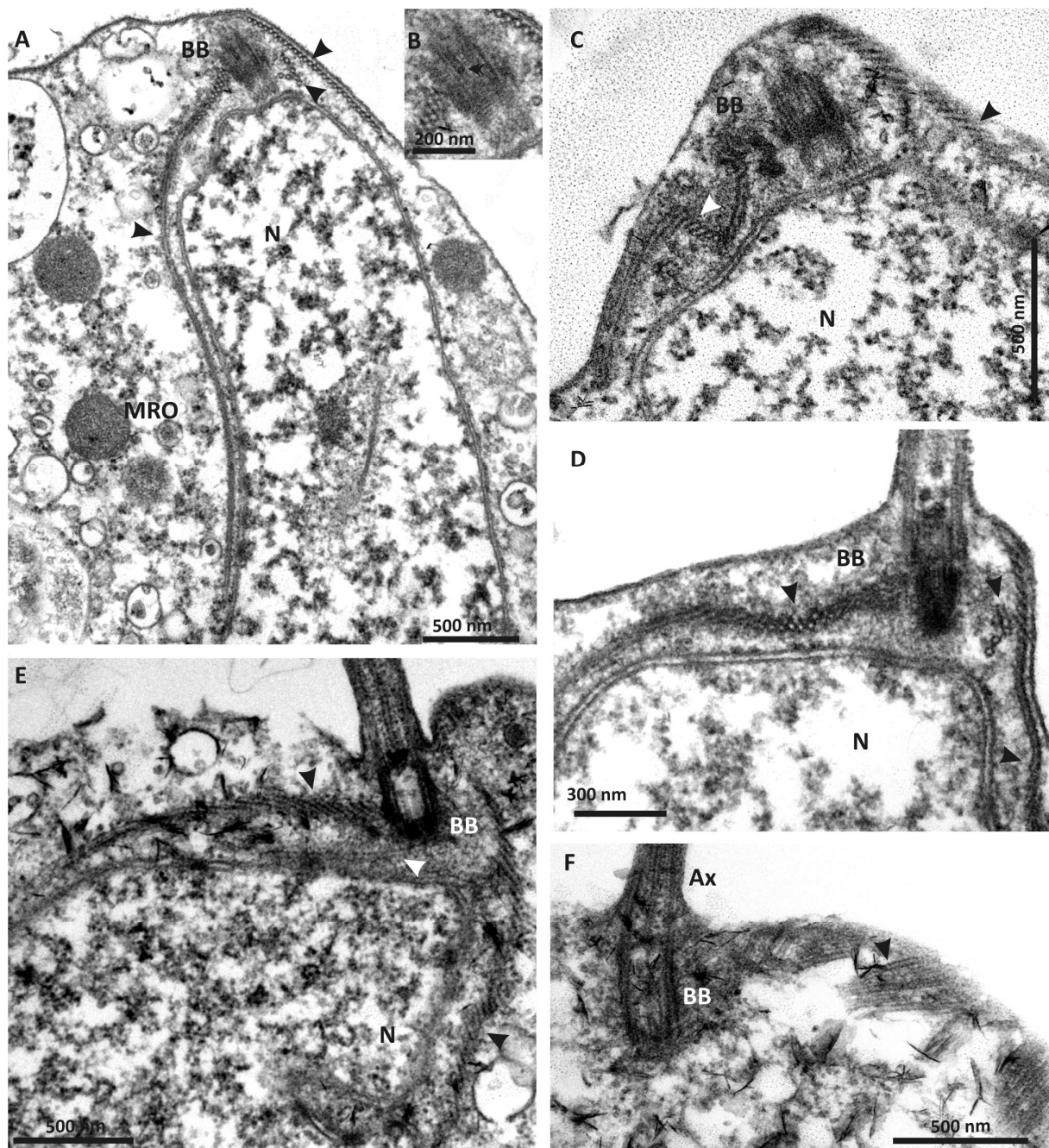
Axonema bičíků má klasickou strukturu, je složena z 9 dvojic mikrotubulů po odvodu a jednoho centrálního páru mikrotubulů ve středu bičíku. V několika případech byla na řezech zachycena axonema procházející tělem buňky (**obr. 27A – D**).

Mastigont organismu PC4AM se zřejmě liší v závislosti na pozorovaném stádiu. V dosud studovaných řezích byl zachycen pouze v buňkách s jedním anteriorním bičíkem. Bazální tělísko bičíku je zachyceno na podélném průřezu na **obr. 28A – F**. Na **obr. 28B** je přitom vidět, že na konci centrálního páru axonemálních mikrotubulů se nachází elektrondenzní globule nebo prstenec, který je podobný *ball-like globule* pozorované u druhů *Percolomonas cosmopolitus* a *Stephanopogon minuta* (Yubuki & Leander 2008a).

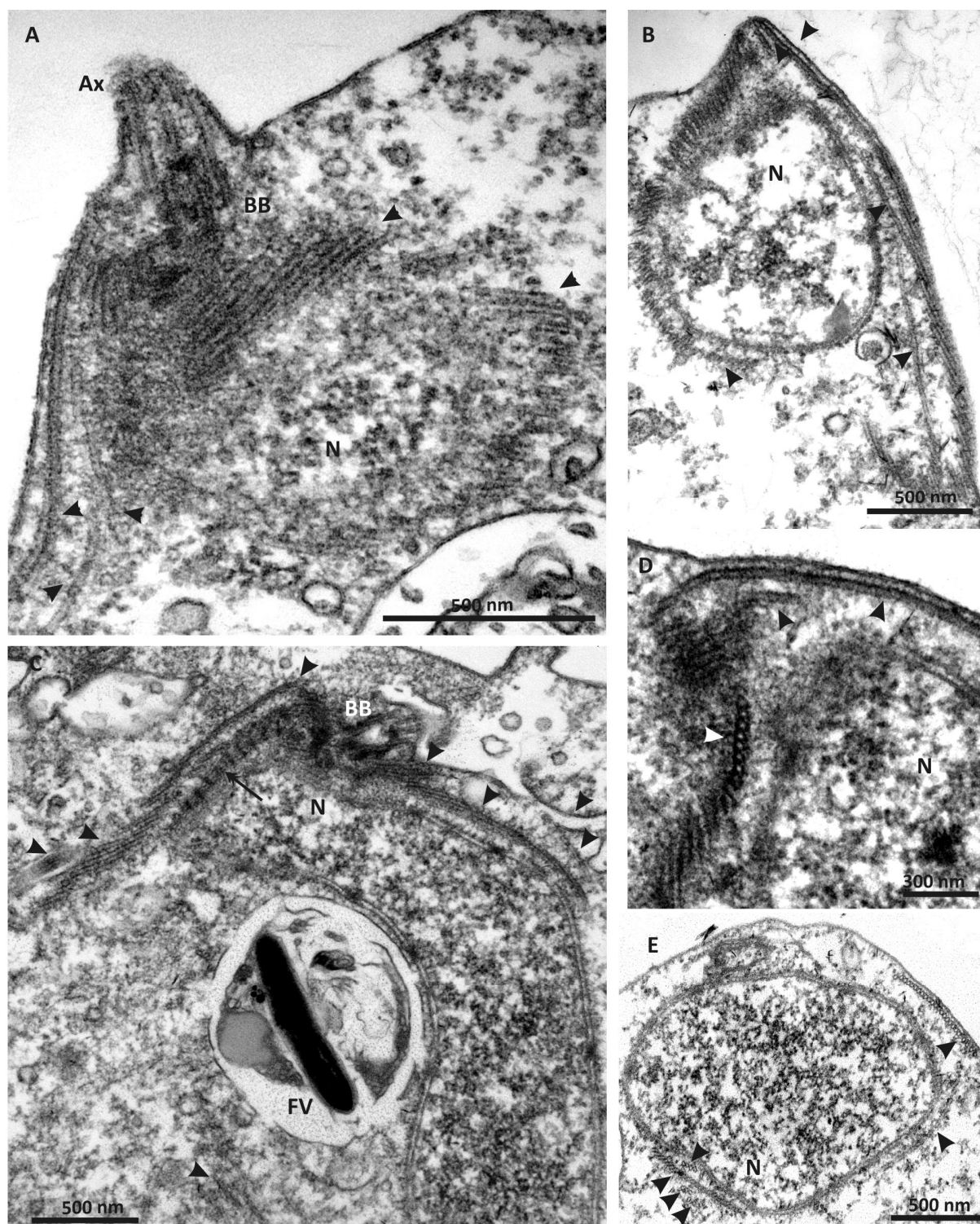
Z okolí bazálního tělíska vychází několik řad mikrotubulů, jejichž průběh buňkou je komplikovaný a z dostupných dat jej dosud nelze rekonstruovat (**obr. 29, 30**). Data získaná z preparátů barvených protargolem naznačují, že se jejich průběh liší i mezi různými jedinci. Je jasné, že alespoň část z těchto mikrotubulů se podílí na vytváření mikrotubulárních štítů, které chrání jádro z horní strany a také po stranách (**obr. 29B, 29E**). Některé prochází až do zadních částí buňky (za jádro). Na **obr. 29C** je patrná i žíhaná fibrila připomínající rhizoplast.



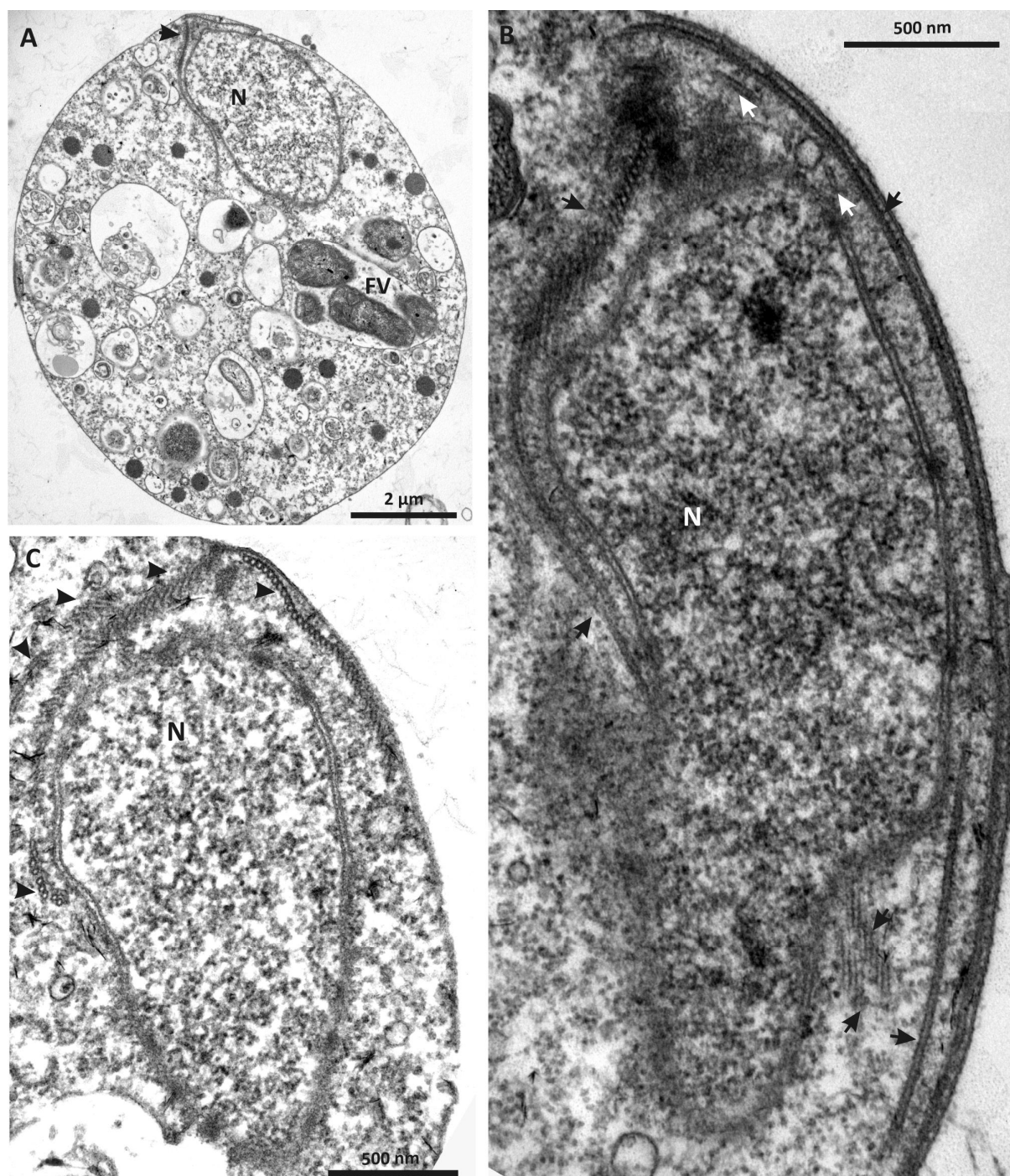
Obr. 27: Internalizované bičíky v buňce organismu PC4AM. A – řez buňkou s viditelnými příčnými průřezy axonemou internalizovaného bičíku, resp. 2 internalizovaných bičíků; B – C detaily příčných průřezů axonemou z obr. A; D – podélný řez axonemou internalizovaného bičíku v jiné buňce. Vysvětlivky: Ax – axonema bičíku; FV – potravní vakuola; N – jádro; jednoduché šípky – lokalizace axonem na průřezu buňkou. Měřítko jsou uvedena na obrázcích.



Obr. 28: Podélný řez mastigontem organismu PC4AM v oblasti bazálního tělíska. A – řez mastigontem v oblasti bazálního tělíska; B – detail bazálního tělíska s *ball-like globule*; C – F podélný řez mastigontem v oblasti bazálního tělíska. Vysvětlivky: Ax – axonema bičíku; BB – bazální tělísko; FV – potravní vakuola; MRO – mitochondriální deriváty; N – jádro; jednoduché šípky – mikrotubuly. Měřítka jsou uvedena na obrázcích.



Obr. 29: Řez mastigontem organismu PC4AM a cytoskeletem procházejícím kolem jádra. A – řez mastigontem v oblasti bazálního tělíska; B – podélný řez mastigontem mimo bazální tělísko; C – šikmý řez mastigontem v oblasti bazálního tělíska; D – podélný řez mastigontem mimo bazální tělísko; E – příčný řez jádrem, které je obklopeno mikrotubuly počínajícími v oblasti bazálního tělíska. Vysvětlivky: Ax – axonema bičíku; BB – bazální tělísko; FV – potravní vakuola; N – jádro. Jednoduché šipky – mikrotubuly; dvojité šipky – žíhaná fibrila; Měřítka jsou uvedena na obrázcích.



Obr. 30: Podélný řez mastigontem organismu PC4M a cytoskeletem procházejícím kolem jádra. A – podélný řez celou buňkou s viditelným mastigontem v oblasti mimo bazální tělísko; B – C podélný řez mastigontem mimo bazální tělísko. Vysvětlivky: FV – potravní vakuola; N – jádro. Jednoduché šipky – mikrotubuly. Měřítko jsou uvedena na obrázcích.

5. DISKUSE

5.1. Hlavní anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae)

Na celém světě v tuto chvíli existuje zřejmě už jen jediný dosud kultivovaný izolát příslušníků hlavní anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae), patří druhu *Sawyeria marylandensis*. Ostatní, včetně jediného dosud kultivovaného izolátu druhu *Psalteriomonas lanterna*, byly ztraceny (Dr. Hackstein a Dr. Silberman, osobní sdělení).

Během této studie bylo získáno a dlouhodobě kultivováno celkem 33 dalších izolátů patřících do hlavní anaerobní linie heteroloboseí. Tyto izoláty představují celkem 7 druhů v 5 rodech. Z těchto druhů nebyly 3 doposud známe (*Percolomonas* sp. 1, *Psalteriomonas* sp.1, EVROS2N gen. sp.). EVROS2N gen. sp. představuje zároveň i nový rod. Druh *Percolomonas descissus* byl na základě fylogenetické analýzy vyčleněn z rodu *Percolomonas* do nového rodu. Během řešení projektu se nepodařilo vykultivovat pouze dva již známé druhy anaerobních heteroloboseí, o kterých se uvažuje, že by mohly být řazeny do této linie, *Lyromonas vulgaris* a *Vahlkampfia anaerobica*. Většina ze získaných izolátů je dosud pěstována a bude je možno využít v dalším výzkumu. Vzhledem k tomu, že pouze jediný ze 34 izolátů anaerobních heteroloboseí (PC4AM) nespadá do hlavní anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae), je možno konstatovat, že tato linie je jednoznačně nejvíce diverzifikovanou skupinou anaerobních heteroloboseí. Její druhová diverzita je nejméně dvakrát větší než se doposud předpokládalo.

Existují v přírodě ještě neobjevené linie Psalteriomonadidae? Najít odpověď na tuto otázku není lehké, ale určité indicie existují. Během řešení této diplomové práce jsme nebyli schopni izolovat a vykultivovat všechny druhy obligátně anaerobních heteroloboseí. Navíc byly v roce 2011 publikovány sekvence dvou extrémně acidofilních heteroloboseí (Amaral Zettler *et al.* 2011), které v analýzách provedených v této diplomové práci tvoří vnitřní linii skupiny Psalteriomonadidae. Lze tedy předpokládat, že skutečná diverzita skupiny Psalteriomonadidae dosud není zcela prozkoumána. Bylo by jistě z tohoto pohledu zajímavé pokusit se v budoucnu o izolaci a kultivaci anaerobních heteroloboseí také v jiných typech habitatů, např. extrémně slaná a extrémně kyselá prostředí. Zdá se totiž, že Psalteriomonadidae jsou také nečekaně ekologicky diverzifikovanou skupinou.

5.1.1. Taxonomické okénko

Pro hlavní anaerobní linii heteroloboseí je v předchozích kapitolách používán název Psalteriomonadidae. Do této čeledi původně patřil jen rod *Psalteriomonas*. Rod *Psalteriomonas* byl přitom vůbec prvním popsáným rodem hlavní anaerobní linie heteroloboseí a čeleď Psalteriomonadidae byla první zavedenou čeledí této linie (Cavalier-Smith 1993a). Až později byl popsán rod *Lyromonas* a čeleď Lyromonadidae (Cavalier-Smith 1993b). Dodnes z rodu *Lyromonas* chybí sekvenční data.

Existuje ale ještě jedna možnost, jak pojmenovat hlavní anaerobní linii heteroloboseí. Vychází ze systému prof. Thomase Cavalier-Smithe. Ten sekupení obligátně anerobních/mikroaerofilních rodů *Monopylocystis* - *Sawyeria* - *Psalteriomonas* - *Lyromonas* označuje jako třídu Lyromonadea (Cavalier-Smith 1993b; Cavalier-Smith & Nikolaev 2008). To se mi jeví ale jako méně vhodná varianta. Jeho systém nebyl vědeckou komunitou přijat, a to ze dvou hlavních důvodů: (a) obsahuje řadu parafyletických skupin a (b) některé z nich v podstatě nejsou definovány. Skupinu, kterou ostatní práce (včetně této) nazývají Heterolobosea, nazývá prof. Cavalier-Smith Percolozoa. Percolozoa se pak dle jeho názoru dělí na podkmeny Tetramitia a Pharyngomonadea (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008). Mezi Pharyngomonadea patří jen rod *Pharyngomonas*, mezi Tetramitia pak všichni ostatní zástupci kmene. Tetramitia se dále dělí na tři třídy: Heterolobosea, Percolatea a Lyromonadea. Heterolobosea ani Percolatea přitom nejsou v jeho systému uspokojivě definovány (Cavalier-Smith 2003). Heterolobosea jsou v podstatě chápána jen jako parafyletická sběrná skupina čekající na další rozdělení (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008).

Nutno ale dodat, že ani původní (a dodnes nejčastěji používaný) systém heteroloboseí založený na práci Page a Blantona (1985) není po této stránce o nic vhodnější. Nedomnívám se ale, že by jeho nahrazení jiným obdobně problematickým systémem bylo v něčem výhodnější.

Osobně se nebráním taxonomické revizi kmene, ať už bude nazván Heterolobosea nebo Percolozoa. Jsem ale přesvědčen, že není k dispozici dostatek dat k provedení jeho poctivého vnitřního rozčlenění, a proto revizi považuji v současné době za předčasnou. Za ideální považuji v tuto chvíli pojmenování dobře podpořených linií, u kterých je možné definovat určité synapomorfie. Nevidím ale důvod, proč by některým z nich měl být přidělen status třídy. V této práci je proto čeleď Psalteriomonadidae chápána v širším smyslu, označuje

všechny zástupce hlavní anaerobní linie heteroloboseí. Název Lyromonadea zde není používán.

5.1.2. Synapomorfie skupiny Psalteriomonadidae

Existují dva základní apomorfní znaky, které sdílí všichni studovaní zástupci skupiny Psalteriomonadidae – mitochondrie bez krist a charakteristický harfovitého útvar v mastigontu bičíkatých stádií. Tento útvar je vytvářen spojením svazku mikrofilament (MB) s kořeny 1. a 4. bičíku na jednom konci a R1 na konci opačném. Harfovitého útvar byl popsán u *Psalteriomonas* i *Lyromonas* (Broers *et al.* 1990, 1993). Dosud nevyslovená, ale z fotografií jasně patrná, je jeho přítomnost též u *Percolomonas descissus* (Brugerolle a Simpson 2004) a v předkládané práci je popsána též u bičíkatého stádia *Monopylocystis visvesvarai*. Kromě toho je dalším společným znakem bičíkatých stádií Psalteriomonadidae přítomnost čtyř bičíků v mastigontu a přítomnost exkavátní rýhy, která nikdy nemá tubulární charakter. Bičíkatá stádia často mají tendenci přisedat k podkladu pomocí zadního konce těla.

5.1.3. Základní vnitřní členění Psalteriomonadidae

Monofylie skupiny Psalteriomonadidae má v provedených fylogenetických analýzách velmi vysokou statistickou podporu. Z provedených fylogenetických analýz je také jasně patrné i její základní vnitřní členění na tři linie: (1) *Sawyeria marylandensis*, *Psalteriomonas* spp. a environmentální sekvence O127706C02 a B334706F06; (2) *Monopylocystis visvesvarai*, 'Pseudomastigamoba longifilum' a *Percolomonas pro parte* spp.; (3) Heterolobosea gen sp. EVROS2N a NY0199.

Vzájemné vztahy mezi těmito třemi liniemi zůstávají v provedených fylogenetických analýzách založených na SSU rDNA nerozřešeny. Linie EVROS2N – NY0199 je buďto v rámci Psalteriomonadidae bazální, nebo je sesterská linii *Monopylocystis* – *Percolomonas pro parte* – 'Pseudomastigamoeba'. V budoucnu bude jistě potřeba osekvenovat další geny ze zástupců Psalteriomonadidae a otázku postavení linie EVROS2N – NY0199 vyřešit. AU test, který by testoval postavení linie EVROS2N – NY0199 nebyl z časových důvodů proveden.

5.1.4. Rozlišení rodů a druhů v rámci Psalteriomonadidae

Bylo velkou výhodou, že se kromě neznámých rodů a druhů podařilo během řešení projektu vykultivovat také již popsané druhy *Psalteriomonas lanterna*, *Monopylocystis visvesvarai* a *Sawyeria marylandensis*. Umožnilo to totiž mnohem lépe odhalit diagnostické znaky jednotlivých rodů a druhů. Pozitivní úlohu sehrálo také barvení jednotlivých izolátů protargolem. Toto barvení doposud nebylo u této skupiny zavedeno.

Pro sladkovodní rod *Psalteriomonas* je charakteristická globule hydrogenosomů umístěná poblíž jádra (**obr. 19E — F**). Při opakovaných pozorování buněk nových izolátů tohoto rodu jádro obsahovalo jedno nebo dvě periferní jadérka (**obr. 16A — G**). V originálním popisu je naproti tomu jadérko buněk *P. lanterna* charakterizováno jako centrální (Broers *et al.* 1990). Konflikt obou pozorování nebylo možné rozhodnout, neboť se nepodařilo spojit s prof. Brugerollem, který prováděl původní transmisní studii *P. lanterna* (Broers *et al.* 1990) a Dr. Hackstein sdělil, že originální kultura *P. lanterna* byla zřejmě ztracena.

Rod *Sawyeria* je sesterský rodu *Psalteriomonas* a je taktéž sladkovodní. Nápadně se od něj odlišuje absencí globule hydrogenosomů. Na rozdíl od rodu *Psalteriomonas* (viz **kap. 2.3.**) u něj nikdy nebylo pozorováno ani bičíkaté stádium. Hydrogenosomy v buňkách rodu *Sawyeria* mají značně unikátní morfologii – některé mají tvar fazole, jiné hluboké mísy (Barberà *et al.* 2010). Jádro obsahuje jedno nebo dvě periferní jadérka.

Mořský rod *Monopylocystis* je jediným zástupcem čeledi Psalteriomonadidae, u něhož byly alespoň někdy pozorovány cysty (kulovité, s jedním pórem; O'Kelly *et al.* 2003). Jadérko má u buněk tohoto rodu podobu tenké vrstvy a je přitisklé na jadernou membránu. Unikátní je také morfologie námi objeveného bičíkatého stádia, jehož exkavátní rýha je téměř stejně dlouhá jako buňka a její okraj se postupně stáčí. Tělo bičíkovce je přitom zploštělé. Bičíky jsou čtyři, v typickém stavu je jeden nejdelší (asi 1,2 — 1,5x delší než buňka), dva středně dlouhé a jeden krátký.

Překvapující bylo zjištění, že i *Percolomonas descissus* a jemu sesterský *Percolomonas* sp. 1 (oba sladkovodní) patří do hlavní anaerobní linie heteroloboseí (do nového rodu). Dosud se nepochybovalo o příbuznosti *Percolomonas descissus* s druhem *Percolomonas cosmopolitus*, který je čeledi Psalteriomonadidae nepříbuzný. Jejich vnější morfologická podobnost je totiž nápadná. Po detailním studiu publikované ultrastruktury druhu *P. descissus* (Brugerolle &

Simpson 2004) lze ale konstatovat, že jeho buňky obsahují oba hlavní apomorfní znaky čeledi Psalteriomonadidae definované výše. Buňky druhů *P. descissus* a *Percolomonas* sp. 1 mají v mastigontu čtyři bičíky, z nichž nejdelší je obvykle delší než buňka, jeden bičík je středně dlouhý (cca 3/5 délky nejdelšího bičíku) a dva bičíky jsou krátké (jen o trochu kratší než bičík střední délky). Cytostom dosahuje 1/3 – 1/2 délky buňky. Poměrně neobvyklá je vysoká míra tvarové variability u bičíkovců tohoto nového rodu (**obr. 10**). Schopnost tvorby měňavkovitého stádia nebyla v nově získaných izolátech *Percolomonas* sp. 1 *Percolomonas descissus* pozorována. Jedinou zmínkou o měňavkovitém stádiu u druhu *P. descissus* zůstává práce Kluga (1936). Při nativním pozorování *Percolomonas* sp. 1 (izolát INDSIP) byly opakově po několika minutách od vytvoření preparátu pozorovány buňky, které ztratily stálý tvar těla. Tato tvarová flexibilita může být pozůstatkem schopnosti tvořit měňavky.

Nový rod zahrnující brakický izolát EVROS2N a mořský izolát NY0199 je relativně podobný druhům *P. descissus* a *Percolomonas* sp. 1. Liší se od nich v délce buňky (o cca 2 – 4 μm kratší) a v délce cytostomu (dosahuje 1/2 až 2/3 délky buňky). Narozdíl od nich je mořský. Ve světle těchto dat je možno považovat obrázky 3F – J v Bernard *et al.* (2000) přiřazované druhu *Percolomonas descissus* za první vyobrazení příslušníků tohoto nového rodu. Naznačuje to i fakt, že tento organismus byl také zachycen v brakickém prostředí, konkrétně v mangrovech Quibray Bay v Austrálii (Bernard *et al.* 2000).

Pokud se týká jednotlivých nově objevených druhů, liší se *Psalteriomonas* sp. 1 od *Psalteriomonas lanterna* zejména velikostí těla (cca o 20 μm delší). *Percolomonas descissus* se od *Percolomonas* sp. 1 liší přítomností formy s dlouhým tnovitým výběžkem na zadním konci těla.

Jistě je diskutabilní, zda by izolát *Monopylocystis visvesvarai* PC4BIC neměl být vyčleněn do samostatného druhu, neboť nikdy netvoří cysty ani měňavku. Takový postoj by však z několika důvodů problematický. Předně jsou známy druhy patřící mezi Heterolobosea, u nichž snadno v kultuře dochází ke ztrátě schopnosti tvořit měňavku (**viz kap. 2.1.**). Naproti tomu u žádného z nově získaných izolátů druhu *Psalteriomonas lanterna* nebyla pozorována bičíkatá forma. Navíc jsou sekvence SSU rDNA získané z originálního izolátu *Monopylocystis visvesvarai* a z izolátu PC4BIC téměř identické (liší se pouze v 5 substitucích). Přestože živné médium bylo u obou izolátů *Monopylocystis* identické, kultury se mohou lišit například

bakteriální mikroflórou. Proto zde izolát PC4BIC raději není považován za samostatný druh, ale za bičíkatou formu *M. visvesvarai*.

5.1.5. Ekologie skupiny Psalteriomonadidae

Psalteriomonadidae obývají sladkovodní, brakické a mořské sedimenty. Během tohoto projektu byli příslušníci čeledi Psalteriomonadidae izolováni z kyslíkem chudých sedimentů Jižní i Severní Ameriky, jižní, východní i západní Evropy a z několika oblastí Asie (Kirgizstán, Indie, Malajsie). Většina vzorků pochází z nadmořských výšek 0 – 700 m.n.m. Izolát KG3N byl naopak přivezen z oblasti velehor (cca 3500 m.n.m.).

Typ habitatu (mořský, resp. brakický či sladkovodní sediment) dobře koresponduje s hlavním členěním Psalteriomonadidae uvedeným v **kap. 5.1.3**. Linie (1) je čistě sladkovodní, linie (2) je mořská i sladkovodní a linie (3) je brakická či mořská. Linie (2) se dále rozpadá na dvě statisticky velmi silně podpořené skupiny – (a) *Monopylocystis* – ‘Pseudomastigamoeba’ (mořské); (b) *Percolomonas descissus* a *Percolomonas* sp. 1 (sladkovodní).

Vedlejším výsledkem této práce je objevení linie Psalteriomonadidae, která obývá extrémně kyselé prostředí bohaté na kovové ionty. Když Amaral-Zettler *et al.* (2011) zkoumali mikrobiální společenstva španělské řeky Río Tinto, osekvenovali přitom SSU rDNA ze dvou heteroloboseí. Fylogenetickou analýzu, která by určila jejich přesnou pozici v rámci kmene Heterolobosea, však autoři studie neprovedli. Tato analýza byla provedena až zde (**obr. 4 – 6**). S vysokou statistickou podporou jsou tyto sekvence příbuzné rodům *Sawyeria* a *Psalteriomonas*. V této souvislosti stojí za zmínku, že též originální izolát *Sawyeria marylandensis* byl získán z prostředí bohatého na železo (O’Kelly *et al.* 2003).

Budoucí výzkum si jistě zaslouží druh *Percolomonas descissus*. Je zajímavé, že tropické izoláty AMT (Tambopata v Amazonii, Peru), PANT1S (Pantanal NP, Brazílie) a SUSBARB (Borneo, Malajsie) tvoří samostatnou linii, ba dokonce mají identickou sekvenci SSU rDNA. Bude potřeba získat a charakterizovat ještě další izoláty *P. descissus* z celého světa a možná sekvenovat i další lokusy, aby bylo možné učinit nějaký prokazatelný závěr. Za tímto účelem jsme zcela nedávno v naší laboratoři kultivovali ještě dva izoláty *P. descissus* z tropické Afriky (Středoafriická republika). Sekvence jejich SSU rDNA jsou identické s izoláty SUSBARB, PANT1 a AMT. Tyto výsledky proto naznačují, že uvnitř druhu *Percolomonas descissus* existuje určitá

geografická diferenciace. Aby se tato hypotéza potvrdila, bude potřeba (1) získat více izolátů *Percolomonas descissus* z tropů celého světa a (2) vzorkovat i v ostatních oblastech světa. Bylo by velmi zajímavé, pokud by se potvrdilo, že je tato linie čistě tropická. Opět lze spekulovat, co by to znamenalo. Představuje tato linie samostatný druh, nebo jde jen o oddělenou populaci *P. descissus*? Určuje její výskyt charakter klimatu? Na tyto otázky bude jistě zajímavé odpovědět, ale dosud získaná data to neumožňují.

5.1.6. Možná fylogenetická pozice druhů *Vahlkampfia anaerobica* a *Lyromonas vulgaris*

Během této studie se nepodařilo kultivovat druhy *Lyromonas vulgaris* a *Vahlkampfia anaerobica*, jejichž fylogenetická pozice proto zůstává neznámá. Vzhledem k tomu, že zde však byla detailně studována a popsána ekologická a morfologická diverzita čeledi Psalteriomonadidae a prostudovány práce o diverzitě ostatních heteroloboseí, je možné pozici těchto dvou druhů alespoň odhadnout.

Vahlkampfia anaerobica je mořská améba. Její jadérko má podobu tenké vrstvy a je přitisklé na jadernou membránu. Tyto znaky sdílí s rodem *Monopylocystis*, přičemž takováto struktura jadérka je dosti neobvyklá. Od měňavky druhu *M. visvesvarai* se však v některých detailech liší (např. její plovoucí forma vytváří paprscité panožky). Lze tedy konstatovat, že *Vahlkampfia anaerobica* je velmi pravděpodobně blízké příbuzná druhu *Monopylocystis visvesvarai* (upozornili na to již O'Kelly *et al.* 2003).

Lyromonas vulgaris je naopak sladkovodní bičíkovec se čtyřmi bičíky. Jeho mastigont obsahuje charakteristickou harfovitou strukturu čeledi Psalteriomonadidae a kromě toho byla v jeho buňce popsána též globule hydrogenosomů. Ta je jinak známa pouze u rodu *Psalteriomonas*. *Lyromonas vulgaris* je proto buďto sesterský rodu *Psalteriomonas*, nebo je dokonce jedním z jeho druhů. Ultrastrukturní podobnost mezi *Psalteriomonas lanterna* a *Lyromonas vulgaris* je natolik velká, že byl tento druh původně popsán jako *Psalteriomonas vulgaris* (Broers *et al.* 1993). Morfologie nově objevených druhů jejich vzájemnou podobnost ještě akcentovala. Je dokonce možné, že *Lyromonas vulgaris* je bičíkatým stádiem zde nově objeveného druhu *Psalteriomonas* sp. 1. V takovém případě by správný název *Lyromonas vulgaris* i *Psalteriomonas* sp. 1 byl *Psalteriomonas vulgaris*.

5.2. Organismus PC4AM

V posledních 10 – 15 letech došlo k velmi výraznému pokroku v pochopení diverzity a evoluce eukaryotických organismů. Důvodem bylo zejména výrazné rozšíření a zlevnění metod umožňujících sekvenaci DNA. Přesto stále existují enigmatické druhy eukaryot s neobvyklou morfologií a nejasným fylogenetickým postavením. Obvykle byly tyto organismy v historii spatřeny pouze několikrát a dosud nebylo možno z nich získat relevantní sekvenční nebo ultrastrukturní data, která by objasnila jejich příbuzenské vazby. Takové organismy právem přitahují pozornost řady biologů. Za všechny prvky, kterých se to týká, lze zmínit např. spironemidy (Foissner & Foissner 1993), „protist y“ (Bernard *et al.* 2000) nebo druh *Meteora sporadica* (Hausmann *et al.* 2002).

Některá dříve popsaná eukaryota nejasného postavení se naopak podařilo v posledních letech podrobně charakterizovat a odhalit jejich fylogenetickou pozici. Typickým příkladem je rod *Telonema*. Pro ten byl na základě čtyřgenové fylogenetické analýzy zaveden nový kmen *Telonemia* patřící do superskupiny Chromalveolata (Shalchian-Tabrizi *et al.* 2006). Podobný osud měla skupina Kathablepharida, jež je podle současných analýz blízce příbuzná skrytěnkám (Okamoto & Inouye 2005). Ebriidi (*Ebria tripartita*), další podivná skupina eukaryot, patří podle fylogenetických analýz mezi cerkomonády (Hoppenrath & Leander 2006). Možná nejznámějším případem tohoto typu je *Breviata anathema*, jež byla původně popsána jako *Mastigamoeba invertens*. Na základě její podrobné charakterizace bylo zjištěno, že jde o samostatnou linii amoebozoí (Walker *et al.* 2006; Minge *et al.* 2009; Roger & Simpson 2009). Vícegenová analýza enigmatického hlenkovitého organismu *Fonticula alba* zase ukázala, že jde o další mnohobuněčnou linii superskupiny Opisthokonta blízce příbuznou rodu *Nuclearia* a sesterskou houbám (Fungi). Jde tak o první případ „hlenkovitého“ způsobu života v celé superskupině Opisthokonta (Brown *et al.* 2010).

Čas od času ale dochází i v současnosti k objevení dosud zcela neznámé hluboké eukaryotické linie. Typickým a velmi známým příkladem takové události je *Chromera velia* (Moore *et al.* 2008), která má zároveň nesmírně důležitou fylogenetickou pozici. Ukázala se totiž být hledaným fotosyntetickým příbuzným výtrusovců (Apicomplexa).

V poslední době bylo objeveno také několik organismů, které mají na poměry skupiny, do níž patří, velice neobvyklou morfologii. Přestože netvoří hluboké eukaryotické linie, ukazují, jak rozmanitými cestami může evoluce dané linie vést. Příkladem je *Rictus lutensis*, který má

vytvořenu ventrální rýhu podobnou exkavátní rýze, ale patří mezi Stramenopila, konkrétně do skupiny Bicosoecida (Yubuki *et al.* 2010). Přestože má unikátní morfologii, obsahuje několik charakteristických ultrastrukturních znaků, které jeho příbuznost s bicosoecidy jednoznačně podporují.

Je zřejmé, že některé z těchto linií jsou nebo mohou být neocenitelnými pomocníky na cestě za pochopením evoluce eukaryotických superskupin nebo dokonce eukaryot jako celku. Je zajímavé, že některé z nich i přes poměrně solidní množství získaných dat zůstávají nezařaditelné, a jsou tak adepty na členy nových, dosud nepopsaných eukaryotických superskupin. Mezi takové organismy patří například apusomonády (Cavalier-Smith & Chao 2010), planomonády (Cavalier-Smith *et al.* 2008) a mantamonády (Glücksman *et al.* 2010). Podobně nezařaditelným organismem je také *Palpitomonas bilix* (Yabuki *et al.* 2010), který sdílí některé znaky se superskupinou Archaeplastida a jiné se skupinou Hacrobia. Za zmínku stojí i rody *Collodyction* a *Diphylleia* (Brugerolle *et al.* 2002).

Během řešení této diplomové práce se podařilo izolovat a převést do stabilní kultury dosud neznámý anaerobní organismus s velmi bizarní morfologií. Domnívali jsme se, že by mohlo jít o poměrně hlubokou linii eukaryot. Důvodem k tomuto tvrzení nebyla jen jeho unikátní morfologie, ale i velmi aberantní sekvence SSU rDNA. Ta v prvotních fylogenetických analýzách neumožňovala zařadit tento organismus do konkrétní eukaryotické skupiny.

Detailní výzkum morfologie tohoto organismu k jeho zařazení nikterak nepomohl. Sekvence dalších dvou genů (pro α -tubulin a β -tubulin) spolu s rozšířením globálního eukaryotického datasetu SSU rDNA o více zástupců heteroloboseí však poskytla uspokojivější výsledky. Po provedení fylogenetických analýz byla stanovena hypotéza, že je tento bizarní organismus příslušníkem skupiny Heterolobosea. Je dokonce možné, že je příbuzný rodu *Stephanopogon*, dalšímu enigmatickému rodu, který se do konkrétní eukaryotické skupiny podařilo definitivně zařadit teprve před 3 lety (Yubuki & Leander 2008a). Stojí ale za zmínku, že ačkoliv jsou oba organismy (PC4AM a *Stephanopogon*) velmi bizarní, jsou si zcela nepodobné a nejsou si bezprostředně příbuzné. Mezi nimi se odvětvují dvě linie druhu *Percolomonas cosmopolitus*, který má naopak morfologii typického heterolobosního bičíkovce.

Nepotvrdilo se tedy, že by organismus PC4AM představoval dosud neznámou hlubokou eukaryotickou linii. Přesto je ale nesmírně zajímavý zejména svou bizarní morfologií. Je tedy příkladem toho, jak se může jedna konkrétní linie extrémně morfologicky pozměnit.

5.2.1. Morfologie PC4AM

Organismus PC4AM je pěstován ve stabilní monoeukaryotické kultuře, kde tvoří několik životních forem. Nejčastější formou je kulovitá buňka s 0 – 2 dlouhými bičíky, které jsou asi 4x – 5x delší než tělo. Z protargolových preparátů jsou na řadě kulovitých buněk vidět malé panožky (obr. **21D**), jimiž tyto buňky fagocytují potravu. Kromě toho se v kultuře objevují i buňky průměrně o 9 µm delší. Tyto buňky nesou 1 – 2 bičíky a nemají stálý tvar těla. Vytváří zřetelné lobopodie, které nejsou eruptivní. Naopak přední část buňky, z níž vychází 1 – 2 bičíky, je vyztužena a drží tvar (viz obr. **22K**).

Poslední identifikovanou životní formou je mnohobičíkovec, který má kromě 2 předních bičíků ještě 12 bičíků po obvodu těla a na rozdíl od předchozích forem se rychle pohybuje. Nemá ale žádný viditelný cytostom. Je proto pravděpodobné, že jde jen o krátkodobé stádium.

Kulovité i velké měňavkovité formy PC4AM mají v cytoplasmě četné cytoskeletární útvary (viz obr. **21**). Je možné, že některé z těchto útvarů jsou ve skutečnosti internalizovanými bičíky, které v případě potřeby dokáže prvok během krátké doby externalizovat (obr. **22**). Transmisně-elektronmikroskopická studie potvrdila, že buňky těchto forem obsahují mnoho různých mikrotubulárních pásů. Ukázala ale také, že v cytoplasmě mohou opravdu být přítomny internalizované axonemy bičíků. Z protargolového barvení je patrné, že bičíky jsou ztlustlé a na konci mají útvar připomínající smyčku. Stojí za zmínku, že nikdy nebyla pozorována velká měňavkovitá forma bez bičíků.

Jednotlivá životní stadia PC4AM se navzájem podobají (1) předními bičíky (extrémně dlouhé, ztlustlé a při barvení protargolem mají často na konci jakousi bublinku nebo smyčku; (2) výrazně granulovanou cytoplasmou buňky; (3) tvarem jádra, které je cca v polovině délky zaškrčené (toto zaškrcení bylo pozorováno nejen u buněk barvených protargolem (obr. **21P – Q**), ale nezávisle též na TEM preparátech (obr. **26A** a **27A**). Roli mnohobičíkatého stadia v životním cyklu nelze z dostupných dat přesně rozřešit. Lze spekulovat o tom, že by mohl být pohlavním stádiem nebo stádiem transportním. Nezodpovězenou otázkou zůstává, jak vypadá mastigont postranních bičíků mnohobičíkovce. Jeho přední bičíky jsou patrně homologické s bičíky měňavkovitého a kulovitého stadia.

Z dosavadních pozorování TEM preparátů se zdá, že mikrotubuly vytváří kolem přední části jádra, alespoň u kulovité a velké měňavkovité formy, řadu struktur, které lze s nadsázkou označit jako „obal“. Podobný útvar není znám u žádných jiných heteroloboseí a připomíná spíš mikrotubulární koš u archaméb a jejich příbuzných (Brugerolle 1991). I od něj se ale podstatně liší, neboť nejde o pravidelně uspořádané mikrotubuly, ale spíše o několik samostatných mikrotubulárních pásů, které probíhají v různých směrech kolem jádra.

Za zmínku stojí i velikost mitochondriálních derivátů v buňkách PC4AM. Svou velikostí cca 500 nm jsou jednoznačně menší než mitochondriální deriváty skupiny Psalteriomonadidae. Bude jistě zajímavé zjistit, jak se liší a v čem se naopak shoduje enzymatická výbava mitochondriálních derivátů těchto dvou anaerobních linií heteroloboseí. Předtím je ale potřeba rozhodnout o přesné fylogenetické pozici PC4AM.

5.2.2. Hypotéza o fylogenetickém postavení PC4AM

Ze všech morfologických dat je naprosto evidentní, že PC4AM je unikátním organismem. Jeho zařazení do konkrétní eukaryotické skupiny není na základě morfologie možné. Východisko přinesly až fylogenetické analýzy. Poskytly velmi silný důkaz, že PC4AM patří mezi Heterolobosea: bootstrapová podpora 97, resp. 91 a Bayesova posteriorní pravděpodobnost 1. Přesnější polohu však ani jednogenové, ani třígenové analýzy nedokázala s dostatečnou podporou určit.

Je ale nutno dodat, že s přibývajícími geny se zvyšuje podpora hypotézy, že je PC4AM blízce příbuzná linii *Percolomonas cosmopolitus* – *Stephanopogon* spp. (bootstrap roste ze 13 u fylogramu založeném pouze na SSUrDNA na 51 u třígenového konkatenátu). Nejlepší topologie stromů získaných fylogenetickou analýzou SSU rDNA byly testovány pomocí AU testu. Ten nedokázal vyloučit možnost, že PC4AM tvoří se skupinou Psalteriomonadidae monofylum. Sekvence SSU rDNA PC4AM je ale vysoce aberantní, takže tento výsledek není překvapující. V budoucnu bude nutné provést AU test ještě u třígenového konkatenátu (metodikou podle Hampl *et al.* 2009). Z časových důvodů však při zpracovávání této diplomové práce nebyl proveden. Lepší statistickou podporu monofylie seskupení *Stephanopogon* spp. – *Percolomonas cosmopolitus* a PC4AM poskytla metoda *Bayesian*

phylogenetic inference (v případě analýzy konkatenátu touto metodou byla Bayesova posteriorní pravděpodobnost 1).

Pokud přijmeme hypotézu, že PC4AM patří mezi Heterolobosea, je nutné pokusit se najít alespoň nějaké morfologické znaky, které by ji podporovaly. Jak bylo uvedeno v **kap. 2.**, vyznačují se Heterolobosea diskovitými mitochondriálními kristami, mnohdy těsně asociovanými s drsným endoplasmatickým retikulem. Klasicky vyvinutý (*stacked*) Golgiho komplex chybí a jaderné dělení je uzavřená intranukleární ortomitóza. Měňavkovitá stádia jsou válcovitá, pohybují se relativně rychle a často mají eruptivní lobopodie (Page & Blanton 1985). Mastigont bičíkatých stádií je obvykle čtyřbičíkatý nebo dvoubičíkatý. Jádru bičíkovců je subapikální a v mastigontu je žíhaná fibrila zvaná rhizoplast. Unikátní pro Heterolobosea je 17-1 helix v sekundární struktuře SSU rRNA (chybí jen u rodu *Pharyngomonas*, který je v rámci heteroloboseí bazální).

V buňce PC4AM můžeme sice nalézt žíhanou fibrilu, nelze ale rozhodnout, zda jde skutečně o rhizoplast. Žíhané fibrily se vyskytují v cytoplasmě většiny eukaryot. Pozorované žíhané fibrile PC4AM se podobá rhizoplast u *Monopylocystis visvesvarai* a *Percolomonas descissus*, periodičita hlavního žíhání je však okolo 35 nm (**obr. 23**; Brugerolle & Simpson 2004). Periodičita hlavního žíhání fibrily v buňce PC4AM je naopak okolo 60 nm (**obr. 29**). Drsné endoplasmatické retikulum je nezřetelné, mitochondriální deriváty nemají kristy. Měňavkovité stádium nemá podobu limax améby, nemá eruptivní lobopodie a nese bičíky. Nelze vyloučit, že v sekundární struktuře SSU rRNA PC4AM existuje 17-1 region. Sekvence SSU rRNA je ale v oblasti předpokládaného 17 – 17-1 – 18 regionu zcela odlišná od sekvencí ostatních heteroloboseí a 17-1 helix proto nelze jednoznačně rozpoznat. PC4AM sice chybí ji *stacked* Golgiho aparát, to však její příbuznost se skupinou Heterolobosea rozhodně nedokazuje. Pokud tedy PC4AM patří mezi Heterolobosea, je to morfologicky nejodvozenější linie této skupiny.

5.2.3. *Stephanopogon* – *Percolomonas cosmopolitus* – PC4AM

Monofylie skupiny *Percolomonas cosmopolitus* – *Stephanopogon* spp. je ve fylogenetických analýzách statisticky velmi dobře podpořena (Cavalier-Smith & Nikolaev 2008; Yubuki & Leander 2008a; Park *et al.* 2009). Navzdory tomu je však morfologie těchto dvou rodů velmi

odlišná. *P. cosmopolitus* reprezentuje typického heterolobosního bičíkovce s širokou exkavátní rýhou dosahující 2/3 délky buňky, má jediné subapikálně umístěné jádro a čtyři bičíky – 1 dlouhý a 3 velmi krátké (Fenchel & Patterson 1986). *Stephanopogon* naproti tomu připomíná spíše nálevníky. Má kalichovité, dorzoventrálně zploštělé tělo s velkým štěrbinovitým cytostomem. V jeho buňce jsou dvě nebo i víc stejnocenných jader. Jeho bičíky jsou uloženy v kapsách. Na ventrální straně těla vyrůstají v 6 – 14 řadách, celkem jich je zde více než 100. Na dorzální straně je bičíků mnohem méně, jen okolo 10 – 20. (Yubuki & Leander 2008b).

Není divu, že synapomorfie této linie se hledaly jen velmi obtížně. Yubuki & Leander (2008a) považují za synapomorfní znak linie *Percolomonas cosmopolitus* – *Stephanopogon* spp. elektrondenční globuli na konci centrálního páru axonemálních mikrotubulů (*ball-like globule*) a přítomnost vláknitých listů připojených k proximálním koncům bazálních tělísek bičíků. Přítomnost těchto znaků u organismu PC4AM musí být ještě detailněji prozkoumána. Z dosavadních řezů se však zdá, že je elektrondenční globule na konci centrálního páru axonemálních mikrotubulů skutečně přítomna (**obr. 28A**). Kromě synapomorfí je však možné mezi organismem PC4AM, rodem *Stephanopogon* a druhem *P. cosmopolitus* možné najít řadu slabších, nikoliv však bezvýznamných podobností. Všichni jsou mořští, mají v jádře centrální nukleolus a jejich endoplasmatické retikulum není, narozdíl od celé řady heteroloboseí, v těsné blízkosti mitochondrií. PC4AM a *Stephanopogon* jsou vzácným příkladem heteroloboseí, kteří mohou mít více než 12 bičíků⁴. Organismus PC4AM stejně jako *Stephanopogon* může být, alespoň za určitých okolností, eukaryovorní (**obr. 25C**).

5.3. Polyfylie *Percolomonas* – konvergence nebo plesiomorfie?

Jedním z výsledků této diplomové práce je zjištění, že i tak morfologicky podobní bičíkovci, jako jsou *Percolomonas cosmopolitus* a *Percolomonas descissus* mohou být nepříbuzní. Oba druhy vypadají podobně nejen svou vnější morfologií, ale i buněčnou strukturou. Díky tomu doposud nikoho nenapadlo jejich příslušnost ke stejnému rodu rozporovat. Jejich bičíky vychází z buňky subapikálně, jejich ventrální rýha má podobu prohlubně dosahující 1/2, respektive 2/3 délky buňky, jeden bičík je delší než ostatní tři a potrava je získávána

⁴ Mnohobičíkatý je dále jen *Psalteriomonas lanterna*, ten má ale čtyři samostatné a stejnocenné mastigonty, každý se 4 bičíky (Broers *et al.* 1990).

synchronním pohybem všech čtyř bičíků, které přihání bakterie do ventrální rýhy. Tento způsob získávání potravy není mezi exkaváty běžný, ale oba druhy jej využívají. Jak *P. cosmopolitus*, tak *P. descissus* mají proměnlivý tvar těla.

Rozdíl mezi *P. descissus* a *P. cosmopolitus* je nápadný jen ve způsobu užití nejdelšího bičíku. *P. cosmopolitus* se s pomocí tohoto bičíky přidrží substrátu, zatímco u *P. descissus* se jeho úloha od úlohy ostatních bičíků neliší. Přes svou nápadnou morfologickou podobnost mají nepochybně oba druhy rozdílnou ekologii. Zatímco *P. cosmopolitus* má diskovité mitochondriální krysty a je aerobní, *P. descissus* má krysty redukované a je anaerobní/mikroaerofilní⁵.

Při studiu publikované ultrastruktury *P. sulcatus*, dalšího druhu rodu *Percolomonas*, si lze povšimnout některých pravděpodobně velmi primitivních znaků (viz Brugerolle & Simpson 2004). Má dva rhizoplasty, dvě dvojice bazálních tělísek jsou umístěny bok po boku a má například i dva mikrofibrilární svazky (MB) a dvě struktury R1. Celkově mastigont *P. sulcatus* působí mnohem primitivněji nežli mastigont *P. cosmopolitus*, *P. descissus* a jiných heteroloboseí. Podobně jako rod *Pharyngomonas* (bazální rod heteroloboseí), má i *P. sulcatus* dva delší bičíky namířené ventrálně. Lze se proto domnívat, že druh *P. sulcatus* nepatří do příbuzenstva ani druhu *P. cosmopolitus*, ani *P. descissus*. Morfologicky připomíná spíše rod *Pharyngomonas* (ultrastruktura rodu *Pharyngomonas* není zatím publikována).

Otázkou zůstává, čím je způsobena morfologická podobnost druhů *P. cosmopolitus*, *P. descissus*, *P. sulcatus* a rodu *Pharyngomonas* (do roku 2008 patřil i *Pharyngomonas* do rodu *Percolomonas*). Jde o náhodu, plesiomorfii nebo konvergenci?

První indicií v hledání odpovědi na tuto otázku je fakt, že rod *Pharyngomonas* má v rámci heteroloboseí bazální postavení, které je podpořeno jak vysokou hodnotou bootstrapů, tak absencí 17-1 helixu v sekundární struktuře SSU rDNA. Druh *P. sulcatus* má primitivní stavbu mastigontu. Druhy *P. cosmopolitus* a *P. descissus* mají sice odvozenější stavbu mastigontu, ale jejich vnější podobnost s *P. sulcatus* a *Pharyngomonas* je přesto velmi nápadná. Z toho důvodu se lze domnívat, že tento morfotyp je pro bičíkaté stádium recentních heteroloboseí plesiomorfni. Je ale také jasné, že původně se musel vyvinout z dvoubičíkatého mastigontu (mastigont heterolobosí má totiž charakter dvojice vývojově propojených dikinetid).

⁵ V této souvislosti není bez zajímavosti, že podobnou morfologii mají také bičíkovci druhů *Lyromonas vulgaris*, *Heterolobosea* gen. sp. EVROS2N a *Monopylocystis visvesvarai*

5.4 Měňavka a bičíkovec – výhody a možné důvody zániku

Je evidentní, že některá Heterolobosea mají měňavkovité stádium jako hlavní trofickou fázi (*Naegleria*, *Willaertia*, *Vahlkampfia*, *Tulamoeba*, *Paravahlkampfia*, *Neovahlkampfia*, *Sawyeria* apod.) a jiná mají jako hlavní trofickou fázi bičíkovce, přičemž měňavkovité stádium u nich není známo (*Pleurostomum*, *Percolomonas cosmopolitus*, *P. descissus*, *P. sulcatus*, Heterolobosea gen. sp. EVROS2N, *Pharyngomonas*, *Lyromonas*, *Stephanopogon*). Lze tedy konstatovat, že během evoluce heteroloboseí opakovaně došlo k potlačení jednoho z těchto trofických stádií. Příkladem může být rod *Naegleria*, jehož bičíkaté stádium je jen dočasné a ztratilo schopnost přijímat potravu.

U některých heteroloboseí však obě stádía (améba a bičíkovec) mají trofickou úlohu a jsou neredukovaná (*Psalteriomonas lanterna*, *Tetramitus* spp. apod.). Možnou výhodou fenotypové plasticity trofozoitů (měňavka a bičíkovec) je možnost lépe nastavit svůj fenotyp podmínkám prostředí. Organismus tak může využít a dále rozvinout možnosti, které mu jednotlivé fenotypy nabízí. Stádium bičíkovce se patrně lépe uplatňuje v prostředí s nedostatkem potravy, protože má schopnost rychlého pohybu a pomocí bičíků může nahánět potravu z blízkého okolí. Stádium měňavky je zřejmě výhodnější v prostředí s dostatkem potravy. Toto je mimo jiné možné vysvětlení faktu, že řada améboflagelátů ztrácí v kultuře, kde je dostatek bakterií, schopnost tvorby bičíkatého stádía (např. *Tetramitus* spp. – Page 1988 nebo všechny nově získané izoláty rodu *Psalteriomonas*).

Monopylocystis visvesvarai je z tohoto úhlu pohledu zajímavý organismus. Na stejném živném médiu v jedné kultuře tvoří pouze améby (O'Kelly *et al.* 2003) a v jiné kultuře jen bičíkovce (PC4BIC, zde). Vysvětlení tohoto fenoménu zatím není známo. Je například možné, že fenotyp se odvíjí také od konkrétního typu potravy (rychlost pohybu bakterií, velikost a druh bakterií apod.). Například améba *Naegleria* sp. dokáže fagocytovat i tak velkou potravu, jakou jsou vlákna sinice druhu *Anabaena flos-aquae* (Xinyao *et al.* 2006). Nelze samozřejmě vyloučit ani genetické rozdíly mezi izoláty (pokud se geny spojené s určitým fenotypem neexprimují po více generací, může dojít k jejich mutacím). Touto otázkou jsem se ale během řešení diplomové práce z časových důvodů hlouběji nezabýval. Pozornost si v budoucnu však jistě zaslouží.

5.5. Kritika druhového konceptu u heteroloboseí

Vytvoření druhového konceptu a přirozeného systému heteroloboseí na základě morfologie buněk je velmi obtížné proto, že jejich amébovitá a bičíkatá stádia spolu sdílí jen velmi málo morfologických charakteristik. Je možné využít struktury jádra, popřípadě cysty (jsou-li známy). To však postačuje pouze pro velmi hrubou orientaci. Relativní nedostatek konstantních fenotypových znaků u měňavek vedl k tomu, že se všechny améby bez bičíkatého stádia a bez pórů v cystách řadily do rodu *Vahlkampfia*. Později se ale ukázalo, že některé z nich by mohly být patogenní (např. Aitken *et al.* 1996; Alexandrakis *et al.* 1998). Z toho důvodu bylo nutné nalézt techniku identifikace, která by umožnila tyto parazitické kmeny rychle určit. Brown & De Jonckheere (1999) proto zavedli určování heteroloboseí na základě jejich fylogenetické pozice na fylogramu SSU rDNA. Později začali prosazovat použití sekvencí ITS regionu (De Jonckheere & Brown 2005), neboť jsou kratší a jejich získání je proto rychlejší. Tento přístup může být užitečný při rychlé, orientační identifikaci parazita. Musím ale jednoznačně odsoudit jeho použití při popisování nových druhů a nových rodů heteroloboseí.

Doposud bylo skutečně publikováno několik prací, v nichž je nový druh heteroloboseí popsán jen na základě odlišnosti v jediném nukleotidu sekvence SSU rDNA, resp. ITS (např. De Jonckheere 2006). Navíc nelze opomenout, že rody *Neovahlkampfia* a *Paravahlkampfia* jsou definovány čistě podle fylogenetické pozice a chybí jakákoliv jejich diagnóza.

Tento přístup má dle mého názoru dva velké problémy. První spočívá v rezignaci na poctivé hledání morfologických, fyziologických a ekologických odlišností, které by ospravedlnily vyčlenění daného izolátu do zvláštního druhu. Zcela se tím stírá rozdíl mezi vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitou. To v situaci, kdy se uvažuje o přítomnosti sexu u heteroloboseí (De Jonckheere 2002; Fritz-Laylin *et al.* 2010), působí jako levná snaha popsat co nejvíce nových taxonů. Vedlejším produktem tohoto přístupu je nedostatek morfologických dat, na jejichž základě bychom se mohli alespoň pokusit o vytvoření relevantní klasifikace heteroloboseí. Druhý problém tohoto přístupu představuje fakt, že jak u SSU rDNA, tak u ITS byla popsána vnitrogenomová variabilita, dokonce i u heteroloboseí (Dyková *et al.* 2006).

5.6. Fakultativně anaerobní předek heteroloboseí?

Jak bylo detailně popsáno v **kap. 2.4.**, *Naegleria gruberi* nese řadu genů pro anaerobní metabolismus a je schopna prosperovat v prostředí s nedostatkem kyslíku (Ginger *et al.* 2010). Druhy *Psalteriomonas lanterna* a *Sawyeria marylandensis* jsou dokonce obligátně anaerobní a jejich mitochondriální derivát můžeme označit jako hydrogenosom (De Graaf *et al.* 2009; Barberà *et al.* 2010). V této práci byla popsána nová linie anaerobních heteroloboseí, organismus PC4AM. Mitochondriální derivát organismu PC4AM je menší než hydrogenosom rodu *Sawyeria* a kromě toho je organismus PC4AM zřejmě mnohem blíže příbuzný rodu *Naegleria* nežli skupině Psalteriomonadidae. Z toho důvodu bude zajímavé zjistit, jaké geny pro anaerobní metabolismus jsou v organismu PC4AM přítomny a zda jsou homologické genům nalezeným u *N. gruberi* nebo u rodu *Sawyeria*.

Barberà *et al.* 2010 vyslovili hypotézu, že by schopnost anaerobního metabolismu mitochondrií mohla být v rámci heteroloboseí velice stará. Tomuto názoru ale odporují některé fylogenetické analýzy. Například FeFe hydrogenáza a IscS u rodu *Naegleria* a *Sawyeria* si nejsou na fylogenetických stromech bezprostředně příbuzné (Barberà *et al.* 2010). Nesmírně zajímavý by z tohoto hlediska mohl být druh *Percolomonas sulcatus*, který je fakultativně endobiotický (střevo žáby), má diskovité mitochondriální krysty a struktura jeho mastigontu naznačuje, že by mohl mít v rámci heteroloboseí poměrně bazální postavení.

Dobrá znalost biochemie mitochondrií anaerobních a fakultativně anaerobních linií heteroloboseí by mohla přinést nové poznatky o evoluci anaerobního energetického metabolismu mitochondrií. Nutný bude v této souvislosti také výzkum mitochondriálního metabolismu u typicky aerobních heteroloboseí a u příbuzných skupiny Psalteriomonadidae. Heterolobosea je pravděpodobně skupinou, u níž lze pozorovat jednotlivé mezistavy od klasické mitochondrie po hydrogenosom.

6. ZÁVĚR

Během řešení práce bylo získáno celkem 34 izolátů anaerobních/mikroaerofilních heteroloboseí, které představovaly 6 rodů v 8 druzích. Dosud neznámé z nich byly 4 druhy a 3 rody. Do jednoho z nově objevených rodů byl zařazen druh *Percolomonas descissus*. Na základě již publikovaných dat bylo také navrženo oddělení druhu *Percolomonas sulcatus* do dalšího (4.) nového rodu. Navržené nové rody a druhy byly jednoznačně definovány na základě morfologických znaků (s pomocí barvení protargolem, pozorování nativních preparátů a v některých případech i částečných TEM studií). Nyní jsou připravovány k popisu.

Ze získaných izolátů spadá 33 do hlavní anaerobní linie heteroloboseí (Psalteriomonadidae). U druhů *Psalteriomonas* sp. 1 a *Monopylocystis visvesvarai* byla pomocí transmisního elektronového mikroskopu studována buněčná struktura. Na základě získaných dat se podařilo stanovit synapomorfie skupiny Psalteriomonadidae. Vzhledem k tomu, že pouze jediný ze 34 izolátů anaerobních heteroloboseí nespadá do skupiny Psalteriomonadidae, je možno konstatovat, že tato linie je jednoznačně nejvíce diverzifikovanou skupinou anaerobních heteroloboseí. Její druhová diverzita je nejméně dvakrát větší než se doposud předpokládalo. Fylogenetická analýza také odhalila, že dvě publikované, ale doposud podrobně neanalyzované environmentální sekvence heteroloboseí představují novou, extrémně acidofilní linii uvnitř skupiny Psalteriomonadidae.

Dále byla objevena nová obligátně – anerobní linie heteroloboseí, organismus PC4AM. Vnější morfologie ani buněčná struktura tohoto organismu nemá v rámci heteroloboseí ani eukaryot srovnání. Sama o sobě neumožňuje zařazení do konkrétní eukaryotické superskupiny. Zařazení tohoto organismu mezi Heterolobosea umožnila až fylogenetická analýza konkatenátu genů pro SSU rRNA, α - a β -tubulinu.

Většina ze získaných izolátů je stále pěstována a bude je možno využít v navazujícím výzkumu.

Z práce vyplývá několik směrů dalšího výzkumu:

1. Studium přechodu mitochondrie na fakultativně a obligátně anaerobní energetický metabolismus (prostřednictvím analýzy transkriptomu organismu)

PC4AM, nově objevených zástupců skupiny Psalteriomonadidae a vybraných aerobních druhů heteroloboseí).

2. Studium geografické diferenciace v rámci druhu *Percolomonas descissus* (prostřednictvím sběru dalších izolátů, sekvenace jejich SSU rDNA a případně i dalších genů).
3. Studium odlišných rolí stádia měňavky a bičíkovce v životním cyklu heteroloboseí (odlišné potravní preference, nároky na prostředí apod.).

7. POUŽITÁ LITERATURA

(sekundární citace jsou označeny * před jménem prvního autora)

Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104 – 2105.

Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV (1996) Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology* **103**: 485 – 494.

Akhmanova A, Voncken FGJ, Hosea KM, Harhangi H, Keltjens JT, Huub JM, Den Kamp NO, Bogels GD, Hackstein JHP (1999) A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Molecular Microbiology* **32**: 1103 – 1114.

Alexander M, Daggett PM, Gherna R, Jong S, Simone F, Hatt H (1980) American Type Culture Collection Methods. 1. Laboratory Manual on Preservation. Freezing and Freeze-Drying as Applied to Algae, bacteria, Fungi and Protozoa. ATCC, Rockville.

Alexandrakis G, Miller D, Huang A (1998) Amebic keratitis due to *Vahlkampfia* infection following corneal trauma. *Archives of Ophthalmology* **116**: 950 – 951.

Amaral Zettler LA, Gomez F, Zettler E, Keenan BG, Amils R, Sogin ML (2002) Eukaryotic diversity in Spain's river of fire. *Nature* **417**: 137.

Amaral Zettler LA, Zettler E, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **5**: 42 – 50.

Anderson OR, Wang W, Faucher SP, Bi K, Shuman HA (2011) A new heterolobosean amoeba *Solumitrus palustris* n.g., n.sp. isolated from freshwater marsh soil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **58**: 60 – 67.

Barberà MJ, Ruiz-Trillo I, Tufts JYA, Bery A, Silberman JD & Roger AJ (2010) *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell* **9**: 1913 – 1924.

Balamuth W, Bradbury PC & Schuster FL (1983) Ultrastructure of the amoeboflagellate *Tetramitus rostratus*. *Journal of Protozoology* **30**: 445 – 455.

Baumgartner M, Eberhardt S, De Jonckheere JF & Stetter KO (2009) *Tetramitus thermacidophilus* n. sp., an Amoeboflagellate from Acidic Hot Springs. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 201 – 206.

Bernard C, Simpson AGB & Patterson DJ (2000) Some free-living flagellates (Protista) from anoxic habitats. *Ophelia* **52**: 113 – 142.

Bonner JT (2003) On the Origin of differentiation. *Journal of Bioscience* **28**: 523 – 528.

Bovee EC (1959) Studies on amebo-flagellates. I. The general morphology and mastigonts of *Trimastigamoeba philippinensis* Whitmore 1911. *Journal of Protozoology* **6**: 69 – 75.

Broers CAM, Stumm CK, Vogels GD & Brugerolle G (1990) *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., spec. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology* **25**: 369 – 380.

Broers, CAM, Meyers HHM, Seymens JC, Stumm CK, Vogels GD & Brugerolle G (1993) Symbiotic association of *Psalteriomonas vulgaris* n. spec. with *Methanobacterium formicicum*. *European Journal of Protistology* **29**: 98 – 105.

Brown S & Day JG (1993) An improved method for the long-term preservation of *Naegleria gruberi*. *Cryo-Letters* **14**: 349 – 354.

Brown S & De Jonckheere JF (1999) A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSU rDNA sequences. *European Journal of Protistology* **35**: 49 – 54.

Brown S & De Jonckheere JF (2004) Isolation of a new vahlkampfiid amoeba from soil: *Paravahlkampfia lenta* n. sp. *European Journal of Protistology* **40**: 289 – 294.

Brown MW, Silberman JD & Spiegel FW (2010) A morphologically simple species of *Acrasis* (Heterolobosea, Excavata), *Acrasis helenhemmesae* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **57**: 346 – 353.

Brugerolle G (1991) Flagellar and cytoskeletal system in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* **164**: 70 – 90.

Brugerolle G, Bricheux G, Phillipe H & Coffe G (2002) *Collodictyon triciliatum* and *Diphylleia rotans* (= *Aulacomonas submarina*) form a new family of flagellates (Collodictyonidae) with tubular mitochondrial cristae that is phylogenetically distant from other flagellate groups. *Protist* **153**: 59 – 70.

Brugerolle G & Simpson AGB (2004) The Flagellar Apparatus of Heteroloboseans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51**: 96 – 107.

Calarco-Gillam PD, Siebert MC, Hubble R, Mitchison T & Kirschner M (1983) Centrosome development in early mouse embryos as defined by an autoantibody against pericentriolar material. *Cell* **35**: 621 – 629.

***Cavalier-Smith T** (1993a) Percolozoa and the symbiotic origin of the metakaryote cell, str. 399 – 406. In H. Ishikawa, M. Ishida & S. Sato (ed.), *Endocytobiology V*. Tübingen University Press, Nemecko.

Cavalier-Smith T (1993b) Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews* **57**: 953 – 994.

Cavalier-Smith T (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpodimonas*, Eopharyngia) and Louksozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1741 – 1758.

Cavalier-Smith T, Chao EE, Stechmann A, Oates B & Nikolaev S (2008) Planomonadida ord. nov. (Apusozoa): Ultrastructural affinity with *Micronuclearia podoventralis* and deep divergences within *Planomonas* gen. nov. *Protist* **159**: 535 – 562.

Cavalier-Smith T & Nikolaev S (2008) The zooflagellates *Stephanopogon* and *Percolomonas* are a clade (Class Percolatea: Phylum Percolozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **55**: 501 – 509.

Cavalier-Smith T & Chao EE (2010) Phylogeny and evolution of Apusomonadida (Protozoa: Apusozoa): New genera and species. *Protist* **161**: 549 – 576.

Dacks JB, Davis LAM, Sjögren AM, Andersson JO, Roger AJ & Doolittle WF (2003) Evidence for Golgi bodies in proposed 'Golgi-lacking' lineages. *Proceeding of the Royal Society B* **270**: S168 – S171.

De Graaf RM, Duarte I, van Alen TA, Kuiper JWP, Schotanus K, Rosenberg J, Huynen MA & Hackstein JHP (2009) The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 287.

De Jonckheere JF (2002) A Century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica* **41**: 309 – 342.

De Jonckheere JF (2006) Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an Island (Tenerife, Spain). *Acta Protozoologica* **45**: 91 – 96.

De Jonckheere JF, Brown S, Walochnik J, Aspöck H & Michel R (2005) Morphological investigation of three *Tetramitus* spp. which are phylogenetically very closely related: *Tetramitus horticolus*, *Tetramitus russelli* n. comb. and *Tetramitus pararusselli* n. sp. *European Journal of Protistology* **41**: 139 – 150.

De Jonckheere JF, Baumgartner M, Opperdoes FR & Stetter KO (2009) *Marinamoeba thermophila*, a new marine heterolobosean amoeba growing at 50 °C. *European Journal of Protistology* **45**: 231 - 236.

De Jonckheere JF, Baumgartner M, Eberhardt S, Oppendoes FR & Stetter KO (2011) *Oramoeba fumarolia* gen. nov., sp. nov., a new marine heterolobosean amoeboflagellate growing at 54°C. *European Journal of Protistology* **47**: 16 – 23.

Dingle AD (1970) Control of flagellum number in *Naegleria*, temperature shock induction of multiflagellate cells. *Journal of Cell Science* **7**: 463 – 481.

Dingle AD & Fulton C (1966) Development of the flagellar apparatus of *Naegleria*. *Journal of Cell Biology* **31**: 43 – 54.

Droop MR (1962) *Heteramoeba clara* n. gen., n. sp., a sexual biphasic amoeba. *Archiv für Mikrobiologie* **42**: 254 – 266.

Dyková I, Pecková H, Fiala I & Dvořáková H (2006) Fish-isolated *Naegleria* strains and their phylogeny inferred from ITS and SSU rDNA sequences. *Folia Parasitologica* **53**: 172 – 180.

Dykstra MJ (1977) The Possible phylogenetic significance of mitochondrial configurations in the acrasid cellular slime molds with reference to members of the Eumycetozoa and Fungi. *Mycologia* **69**: 579 – 591.

Edgcomb VP, Roger AJ, Simpson AGB, Kysela DT & Sogin ML (2001) Evolutionary relationships among „jakobid“ flagellates as indicated by alpha- and beta- tubulin phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 514 – 522.

Elwood HJ, Olsen GJ & Sogin ML (1985) The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution* **2**: 399 – 410.

Embley M (2006) Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philosophical Transactions of The Royal society B* **361**: 1055 – 1067.

Embley TM, Horner DS & Hirt RP (1997) Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? *Trends in Ecology and Evolution* **12**: 437 – 441.

Erdos GW & Raper KB (1978) Ultrastructural aspects of two species of *Guttulinopsis*. *American Journal of Botany* **65**: 552 – 561.

Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* **5**: 164 – 166.

Fenchel T & Patterson DJ (1986) *Percolomonas cosmopolitus* (Ruinen) n. gen., a new type of filter-feeding flagellate from marine plankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **66**: 465 – 482.

Foissner I & Foissner W (1993) Revision of the family Spironemidae Doflein (Protista, Hemimastigophora), with description of two new species, *Spironema tericolla* n. sp. and *Spireonema geiseri* n. g., n sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **40**: 422 – 438.

Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J, Shu S, Neupane R, Cipriano M, Mancuso J, Tu H, Salamov A, Lindquist E, Shapiro H, Lucas S, Grigoriev IV, Cande WZ, Fulton C, Rokhsar DS & Dawson SC (2010) The Genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**: 631 – 642.

Fulton C (1977) Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis. *Journal of Supramolecular Structure* **6**: 13 – 43.

Fulton C & Dingle AD (1971) Basal bodies, but not centrioles in *Naegleria*. *Journal of Cell Biology* **51**: 826 – 836.

Fulton C & Walsh C (1980) Cell differentiation and flagellar elongation in *Naegleria gruberi*. Dependence on transcription and translation. *Journal of Cell Biology* **85**: 346 – 360.

Garstecki T, Brown S & De Jonckheere JF (2005) Description of *Vahlkampfia signyensis* n. sp. (Heterolobosea), based on morphological, ultrastructural and molecular characteristics. *European Journal of Protistology* **41**: 119 – 127.

Ginger ML, Fritz-Laylin LK, Fulton C, Cande WZ & Dawson SC (2010) Intermediary metabolism in protists: a sequence-based view of facultative anaerobic metabolism in evolutionary diverse eukaryotes. *Protist* **161**: 642 – 671.

Glücksman E, Snell EA, Berney C, Chao EE, Bass D & Cavalier-Smith T (2010) The novel marine gliding zooflagellate genus *Mantamonas* (Mantamonadida ord. n.: Apusozoa). *Protist* **162**: 207 – 221.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95 – 98.

Hampel V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB & Roger AJ (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **106**: 3859 – 3864.

Han JW, Park JH, Kim M & Lee J (1997) mRNAs for microtubule proteins are specifically colocalized during the sequential formation of basal body, flagella, and cytoskeletal microtubules in the differentiation of *Naegleria gruberi*. *Journal of Cell Biology* **137**: 871 – 879.

Hausmann K, Weitere M, Wolf M & Arndt H (2002) *Meteora sporadica* gen. nov. et sp. nov. (Protista incertae sedis) – an extraordinary free-living protist from the Mediterranean deep sea. *European Journal of protistology* **38**: 171 – 177.

Hawes RSJ (1963) On *Rosculus ithacus* gen. n., sp. n. (Protozoa, Amoebina), with special reference to its mitosis and phylogenetic relations. *Journal of Morphology* **113**: 139 – 145.

Hepler PK (1976) The blepharoplast of *Marsilea*: its *de novo* formation and spindle association. *Journal of Cell Science* **21**: 361 – 390.

Hoppenrath M & Leander BS (2006) Ebriid phylogeny and the expansion of the Cercozoa. *Protist* **157**: 279 – 290.

Hrdy I & Müller M (1995) Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Molecular Evolution* **41**: 388 – 396.

Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees. *Bioinformatics* **17**, 754 – 755

Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 307 – 317.

Katoh K, Misawa K, Kuma K & Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059 – 3066.

Klug G (1936) Neue oder wenig bekannte Arten der Gattungen *Mastigamoeba*, *Mastigella*, *Cercobodo*, *Tetramitus* und *Trigonomonas*. *Archiv für Protistenkunden* **87**: 97 – 116.

Kolisko M, Cepicka I, Hampl V, Leigh J, Roger AJ, Kulda J, Simpson AGB & Flegr J (2008) Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: Implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 205.

Kolisko M, Silberman JD, Cepicka I, Yubuki N, Takishita K, Yabuki A, Leander BS, Inouye I, Inagaki Y, Roger AJ & Simpson AGB (2010) A Wild Diversity of Previously Undetected Free-Living Relatives of Diplomonads Isolated from Marine/Saline Habitats. *Environmental Microbiology* **12**: 2700 – 2710.

Larson DE & Dingle AD (1981) Isolation, ultrastructure and protein composition of the flagellar rootlet of *Naegleria gruberi*. *Journal of Cell Biology* **89**: 424 – 432.

Larsen J & Patterson DJ (1990) Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. *Journal of Natural History* **24**: 801 – 937.

Lee J (2010) *De novo* formation of basal bodies during cellular differentiation of *Naegleria gruberi*: Progress and hypotheses. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**: 156 – 162.

Lipscomb DL & Corliss JO (1982) *Stephanopogon*, a phylogenetically important "Ciliate" shown by ultrastructural studies to be a flagellate. *Science* **215**: 303 – 304.

Littlewood DTJ & Smith AB (1995) A combined morphological and molecular phylogeny for sea urchins (Echinoidea: Echinodermata). *Philosophical Transactions of The Royal Society London B* **347**: 213 – 234.

Medlin L, Elwood HJ, Stickel S & Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**: 491 – 499.

Michel R, Raether R, Schupp E (1987) Ultrastructure of the amoeba-flagellate *Protonaegleria westphali*. *Parasitology research* **14**: 23 – 29.

Milyutina IA, Aleshin VV, Mikrjukov KA, Kedrova OS & Petrov NB (2001) The unusually long small subunit ribosomal RNA gene found in amitochondriate amoeboflagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication. *Gene* **272**: 131 – 139.

Minge MA, Silberman JD, Orr RJS, Cavalier-Smith T, Shalchian-Tabrizi K, Burki F, Skjæveland A & Jakobsen KS (2009) Evolutionary position of breviate amoebae and the primary eukaryote divergence. *Proceedings of the Royal Society of London B* **276**: 597 – 604.

Moore RB, Obornik M, Janouskovec J, Chrudimsky T, Vancova M, Green DH et al. (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**: 896 – 897.

Murtagh GJ, Dyer PS, Rogerson A, Nash GV & Laybourn-Parry J (2002) A new species of *Tetramitus* in the benthos of a saline antarctic lake. *European Journal of Protistology* **37**: 437 – 443.

Murase J, Kawasaki M & De Jonckheere JF (2010) Isolation of a new heterolobosean amoeba from rice field soil: *Vrihiamoeba italica* gen. nov., sp. nov. *European Journal of Protistology* **46**: 164 – 170.

Mus F, Dubini A, Seibert M, Posewitz MC & Grossman AR (2007) Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 25475 – 25486.

Nebesářová J (2002) Elektronová mikroskopie pro biology. www.paru.cz/lem/book. Přístup 8. 1. 2011.

Nie D (1950) Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the guinea-pig *Cavia porcella*. *Journal of Morphology* **86**: 391 – 493.

Nikolaev SI, Mylnikov AP, Berney C, Fahrni J, Pawlowski J, Aleshin VV & Petrov NB (2004) Molecular phylogenetic analysis places *Percolomonas cosmopolitus* within Heterolobosea: Evolutionary implications. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51**: 575 – 581.

Okamoto N & Inouye I (2005) The Katablepharids are a distant sister group of the Cryptophyta: A proposal for Katablepharidophyta divisio nova/Kathablepharida phylum novum based on SSU rDNA and beta-tubulin phylogeny. *Protist* **156**: 163 – 179.

O'Kelly CJ, Silberman JD, Amaral Zettler LA, Nerad TA & Sogin ML (2003) *Monopylocystis visvesvarai* n. gen., n. sp. and *Sawyeria marylandensis* n. gen., n. sp.: Two new amitochondrial heterolobosean amoebae from anoxic environments. *Protist* **154**: 281 – 290.

Olive LS (1970) The Mycetozoa: A Revised classification. *Botanical review* **36**: 59 – 89.

Olive LS & Stoianovitch C (1960) Two new members of the Acrasiales. *Bulletin of Torrey Botanical Club* **87**: 1 – 20.

Olive LS, Stoianovitch C & Bennet WE (1983) Descriptions of acrasid cellular slime molds: *Pocheina rosea* and a new species, *Pocheina flagellata*. *Mycologia* **75**: 1019 – 1029.

Outka DE & Kluss BC (1967) The amoeba-to-flagellate transformation in *Tetramitus rostratus*. II. Microtubular morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **35**: 323 – 346.

Page FC (1988) A New key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biology Association, Ambleside, UK.

Page FC & Blanton RL (1985) The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica* **21**: 121 – 132.

Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357 – 358.

Park JS, Simpson AGB, Lee WJ & Cho BC (2007) Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). *Protist* **158**: 397 – 413.

Park JS, Simpson AGB, Brown S & Cho BC (2009) Ultrastructure and molecular phylogeny of two heterolobosean amoebae, *Euplaesiobystra hypersalinica* gen. et sp. nov. and *Tulamoeba peronaphora* gen. et sp. nov., isolated from an extremely hypersaline habitat. *Protist* **160**: 265 – 283.

Patterson M, Woodworth TW, Marciano-Cabral F & Bradley SG (1981) Ultrastructure of *Naegleria fowleri* Enflagellation. *Journal of Bacteriology* **147**: 217 – 226.

Patterson DJ & Brugerolle G (1988) The ultrastructural identity of *Stephanopogon apogon* and the relatedness of the genus to other kinds of protists. *European Journal of Protistology* **23**: 279 – 290.

Patterson DJ, Rogerson A, Vørs N (2000a) Class Heterolobosea. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds.): The Illustrated Guide to the Protozoa, Second edition. Society of Protistologists 1104 – 1111.

Patterson DJ, Vørs N, Simpson AGB, O'Kelly C (2000b) Residual free-living and predatory heterotrophic flagellates. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds.): The Illustrated Guide to the Protozoa, Second edition. Society of Protistologists 1302 – 1328.

Perty M (1852) Zur Kenntnis kleinster Lebensformen nach Bau, Funktionen, Systematic, mit der Spezialverzeichnis der in der Schweiz beobachteten Arten. Bern.

Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817 – 818.

Preston TM & King CA (2003) Locomotion and phenotypic transformation of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* at the water–air interface. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **50**: 245 – 251.

Ptáčková E (2010) Fylogeneze archaméb. Diplomová práce, PŘF Univerzity Karlovy.

Riparbelli MG & Callaini G (2003) *Drosophila* parthenogenesis: a model for *de novo* centrosome assembly. *Developmental Biology* **260**: 298 – 313.

Robinson BS, Christy PE, De Jonckheere JF (1989) A temporary flagellate (mastigote) stage in the vahlkampfiid amoeba *Willaertia magna* and its possible evolutionary significance. *BioSystems* **23**: 75 – 86.

Roger AJ, Simpson AGB (2009) Evolution: Revisiting the root of the Eukaryote tree. *Current Biology* **19**: R165 – R167.

Rothschild LJ & Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092 – 1101.

Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS & Martin W (2001) Pyruvate:NADP oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protist. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 710 – 720.

Sawyer TK (1980) Marine amebae from clean and stressed bottom sediments of the atlantic ocean and Gulf of Mexico. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **27**: 13 – 32.

Shalchian-Tabrizi K, Eikrem W, Klaveness D, Vulot D, Minge M, Le Gall F, Romari K, Thronsen J, Botnen A, Massana R, Thomsen HA, Jakobsen K (2006) Telonemia, a new protist phylum with affinity to chromist lineages. *Proceedings of the Royal Society of London B* **273**: 1833 – 1842.

Sheehan KB, Ferris MJ, Henson JM (2003) Detection of *Naegleria* sp. in a Thermal, Acidic Stream in Yellowstone National Park. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **50**: 263 – 265.

Shimodaira H (2002) An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology* **51**: 492 – 508.

Shimodaira H & Hasegawa M (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* **17**: 1246 – 1247.

Simpson AGB (2003) Cytoskeletal organisation, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1759 – 1777.

Simpson AGB, Perley TA & Lara E (2008) Lateral transfer of the gene for a widely used marker, α -tubulin, indicated by a multi-protein study of the phylogenetic position of *Andalucia* (Excavata). *Molecular Phylogenetics & Evolution* **47**: 366 – 377.

Smirnov AV & Fenchel T (1996) *Vahlkampfia anaerobica* n. sp. and *Vanella peregrinia* n. sp. (Rhizopoda): anaerobic amoebae from a marine sediment. *Archiv für Protistenkunden* **147**: 189 – 198.

Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688 – 2690.

Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Verze 4*B10. Sinauer Associates.

Visvesvara GS, Moura H & Schuster FL (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **50**: 1 – 26.

Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Norman J, Pieniazek NJ & Cabral GA (2009) *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amebic meningoencephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 357 – 366.

Walker G, Dacks JB & Embley TM (2006) Ultrastructural description of *Breviata anathema*, n. gen., n. sp., the organism previously studied as 'Mastigamoeba invertens'. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **53**: 65 – 78.

Wallace RB, Johnson MJ, Suggs SV, Ken-ichi M, Bhatt R & Keiichi I (1981) A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* **16**: 21 – 26.

Walsh CJ (2007) The role of actin, actomyosin and microtubules in defining cell shape during the differentiation of *Naegleria* amebae into flagellates. *European Journal of Cell Biology* **86**: 85 – 98.

Walochnik J & Mulec J (2009) Free-living amoebae in carbonate precipitating microhabitats of karst caves and a new vahlkampfiid amoeba, *Allovahlkampfia spelea* gen. nov., sp. nov. *Acta Protozoologica* **48**: 25 – 33.

Wessberg KL, Skolnick S, Xu J, Marciano-Cabral F & Kemp RG (1995) Cloning, sequencing and expression of the pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase from *Naegleria fowleri*. *Journal of Biochemistry* **307**: 143 – 149.

***Whitmore ER** (1911) Studien über Kulturamöben aus Manila. *Archiv für Protistenkunden* **23**: 81 – 95.

Wuyts J, Van de Peer Y & Wachter RD (2001) Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **29**: 5017 – 5028.

Wuyts J, Perrière G & Van de Peer Y (2004) The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research* **32**: D101 – D103.

Xinyao L, Miao S, Yonghong L, Yin G, Zhongkai Z, Donghui W, Weizhong W & Chencai A (2006) Feeding characteristics of an amoeba (Lobosea: *Naegleria*) grazing upon cyanobacteria: food selection, ingestion and digestion progress. *Microbial Ecology* **51**: 315 – 325.

Yoon HS, Grant J, Tekle YI, Wu M, Chaon BC, Cole JC, Logsdon Jr. JM, Patterson DJ, Bhattacharya D, Katz LA (2008) Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 14.

Yabuki A, Inagaki Y & Ken-ischiro I (2010) *Palpitomonas bilix* gen. et sp. nov.: A novel deep-branching heterotroph possibly related to Archaeplastida or Hacrobia. *Protist* **161**: 523 – 538.

Yubuki N & Leander BS (2008a) Ultrastructure and molecular phylogeny of *Stephanopogon minuta*: An enigmatic microeukaryote from marine interstitial environments. *European Journal of Protistology* **44**: 241 – 253.

Yubuki N & Leander BS (2008b) *Stephanopogon*. Version 23 September 2008, in The Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org>).

Yubuki N, Leander BS & Silberman JD (2010) Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel phagotrophic stramenopile from low oxygen environments: *Rictus lutensis* gen et sp. nov. (Bicosoecida, incertae sedis). *Protist* **161**: 264 – 278.

Zucker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**: 3406 – 3415.